

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA**



**Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**  
**Corso di Laurea in Biologia Applicata alla Biomedicina**

*Tesi di Laurea*

**BETATROFINA: UN POTENZIALE NUOVO  
MARCATORE DELLA FUNZIONALITA' BETA  
CELLULARE NELLA PATOLOGIA DIABETICA**

***Relatori:***

*Prof. Stefano DEL PRATO*

*Dott. Roberto LUPI*

***Candidata:***

*Paola URSOLEO*

*Anno Accademico 2013/2014*

*A Me  
E  
Alla Mia Famiglia*

## **Riassunto**

Come noto, il diabete è una patologia causata da una disfunzione del metabolismo dei carboidrati dovuto, essenzialmente, a una ridotta secrezione o azione dell'insulina. Questa malattia negli ultimi anni ha visto un aumento del suo tasso d'incidenza, con una prevalenza che viene attualmente stimata intorno al 2.8% della popolazione mondiale. Le due principali forme sono rappresentate dal diabete mellito tipo 1, causato da un attacco autoimmune alle beta-cellule pancreatiche, il diabete mellito tipo 2, caratterizzato da insulino-resistenza, ridotta secrezione dell'insulina e morte beta-cellulare. Anche se la patologia può essere controllata attraverso iniezione sottocutanea d'insulina o con farmaci antidiabetici, questi trattamenti non offrono lo stesso grado di controllo glicemico come quello dato dalle beta-cellule funzionanti, e non sono in grado di impedire la progressione delle complicanze associate ai tessuti periferici. Negli ultimi anni, l'attenzione dei ricercatori si è incentrata sullo studio di un gene chiamato C19orf80 nell'uomo e Gm6484 nel topo, che regola la secrezione fisiologica di un ormone, comunemente noto come betatrofina. In un lavoro condotto su modelli animali, la betatrofina si poneva come una molecola promettente per la cura del diabete mellito sia di tipo 1 che di tipo 2, poiché aveva un ruolo nello stimolare la formazione di nuove cellule capaci di produrre insulina. Questi dati promettenti sono stati il presupposto per un gruppo di ricercatori svedesi che hanno studiato i livelli di questa molecola in persone con diabete di tipo 1: in questi pazienti, al contrario di quanto ci si aspettasse, la concentrazione dell'ormone è risultata addirittura superiore rispetto ai soggetti sani. Anche se il semplice aumento della betatrofina non sembra, per il momento, essere sufficiente a proteggere le persone dal diabete, tuttavia lo studio ha evidenziato che questa molecola poteva rappresentare un meccanismo fisiologico sia di conservazione delle cellule insulino-secerenti sia di protezione dall'insorgenza del diabete stesso. Tuttavia, in letteratura non sono attualmente presenti molti studi sull'uomo e, anche per quanto riguarda il diabete mellito di tipo 2, i pochi lavori pubblicati sono stati condotti prevalentemente su modello animale.

In questa tesi, per la prima volta, è stata valutata la presenza e la concentrazione di betatrofina in una popolazione eterogenea di soggetti diabetici e di pazienti sottoposti a trapianto di pancreas. Sono state osservate delle correlazioni con parametri antropometrici, glicometabolici e di funzionalità pancreatica, in particolare c-peptide, che, assieme alla normalizzazione dell'ormone nei pazienti trapiantati, suggeriscono un ruolo potenziale della betatrofina come biomarker di funzionalità, o della massa, delle cellule beta-pancreatiche.

Se la betatrofina possa essere regolata da alcuni fattori analizzati in questo studio, quali la lunghezza telomerica e la presenza di polimorfismi, dovrà essere approfondita aumentando il numero di soggetti e valutandone la modulazione nel tempo.

## **Abstract**

As you know, diabetes is a disease caused by a dysfunction of carbohydrate metabolism due, essentially, to a reduced secretion or insulin action. This disease in recent years has seen an increase in its incidence rate, with a prevalence which is currently estimated at 2.8% of the world population. The two main forms are represented by diabetes mellitus type 1, caused by an autoimmune attack on the pancreatic beta cells, diabetes mellitus type 2 is characterized by insulin resistance, impaired insulin secretion and beta cell death. Although the disease can be controlled through subcutaneous injection of insulin or antidiabetic agents, these treatments do not offer the same degree of glycemic control such as that given by the beta-cell functioning, and are not able to prevent the progression of the complications associated to the tissues peripheral. In recent years, the attention of researchers focused on the study of a gene called C19orf80 Gm6484 humans and in mice, which regulates the physiological secretion of a hormone, commonly known as betatrophin. In a study conducted in animal models, the betatrophin arose as a promising molecule for the treatment of diabetes mellitus, both type 1 and type 2, because he had a role in stimulating the formation of new cells capable of producing insulin. These promising data were the basis for a group of Swedish researchers who have studied the levels of this molecule in people with type 1 diabetes in these patients, contrary to what was expected, the hormone concentration was even higher compared to healthy subjects. Although simply increasing the betatrophin does not seem, for the moment, be sufficient to protect people from diabetes, but the study showed that this molecule could be a physiological mechanism is preservation of insulin-secreting cells is protective onset diabetes itself. However, in the literature are not currently present many studies on humans and, also as regards diabetes mellitus type 2, the few published works have been conducted mainly on animal model. In this thesis, for the first time, was evaluated the presence and concentration of betatrophin in a heterogeneous population of diabetic subjects and patients undergoing pancreas transplantation. Were observed correlations with anthropometric parameters, glucometabolic and pancreatic function, in particular

c-peptide, which, together with the normalization of the hormone in transplant patients, suggesting a potential role of betatrophin as a biomarker of functionality, or the mass of cells beta-pancreatic. If the betatrophin can be controlled by some factors analyzed in this study, such as telomere length and the presence of polymorphisms, it must be confirmed by increasing the number of subjects and assessing the modulation in time.

# **Indice**

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>III</b>
<b>INDICE .....</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1.1 Cenni sul diabete .....</b>	<b>VIII</b>
1.1.1 Diabete mellito tipo 2 .....	X
1.1.2. Diabete mellito tipo 1 .....	12
<b>1.2 Terapie di gestione del diabete.....</b>	<b>13</b>
1.2.1. Terapia per il diabete mellito di tipo 1 .....	13
1.2.2. Terapia per il diabete mellito di tipo 2 .....	14
1.2.3. Terapie future per la cure del diabete.....	15
<b>1.3. Betatrofina: un nuovo ormone che controlla la proliferazione delle         β-cellule.....</b>	<b>16</b>
1.3.1. La betatrofina e il metabolismo dei trigliceridi .....	23
1.3.2. Betatrofina e diabete.....	28
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Reclutamento dei pazienti e raccolta dei campioni biologici.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Dosaggio proteico con metodo Bradford.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3. Western Blot .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4. Dosaggio della betatrofina con metodica ELISA .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5. Dosaggio dell'insulina e del C-peptide con metodo I.R.M.A         (ImmunoRadioMetricAssay).....</b>	<b>41</b>
<b>3.6. Dosaggio della glicemia .....</b>	<b>43</b>

3.7. Dosaggio dei trigliceridi mediante metodo enzimatico colorimetrico .....	44
3.8. Estrazione di DNA genomico da sangue .....	45
3.9. Quantificazione del DNA estratto .....	46
3.10. Isolamento dei linfomonociti da sangue periferico .....	47
3.11. Estrazione dell'RNA totale .....	49
3.12. Quantificazione dell'RNA totale estratto .....	50
3.13. Retrotrascrizione dell'RNA totale estratto .....	51
3.14. PCR Real-Time .....	52
3.15. Valutazione dell'espressione genica della LPL mediante Real-Time PCR Sybr Green .....	55
3.16. Genotipizzazione di SNP con metodica Real-Time RT-PCR TaqMan .....	57
3.17. Studio della lunghezza dei telomeri mediante multiplex Real-Time QPCR .....	58
3.18. Analisi statistica .....	60
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>61</b>
4.1. Principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio .....	61
4.2. Valutazione dell'espressione proteica plasmatica di betatrofina in soggetti ND, T1DM, T2DM e TX .....	61
4.3. Valutazione della concentrazione plasmatica di betatrofina nei soggetti arruolati per lo studio. ....	62
4.4. Correlazione fra il valore plasmatico di betatrofina, caratteristiche antropometriche, parametri glicometabolici e di funzionalità pancreatica in tutti i soggetti arruolati per lo studio. ....	66



4.5. Correlazione fra il valore plasmatico di betatrofina e la glicemia dopo curva da carico.....	71
4.6. Valutazione della concentrazione plasmatica di betatrofina nei soggetti ND, T1DM, T2DM e TX.....	72
4.7. Valutazione dell'espressione genica per LPL nei soggetti ND, T1DM, T2DM e TX.....	73
4.8. Valutazione della lunghezza telomerica nei soggetti ND, T1DM, T2DM e TX. ....	74
4.9. Frequenza allelica per i polimorfismi rs1541922 (C/T) e rs892066 (C/G), nell'intera popolazione analizzata.....	76
5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONI.....	78
6. BIBLIOGRAFIA.....	83
7. RINGRAZIAMENTI.....	100

# 1. Introduzione

## 1.1 Cenni sul diabete

Il diabete mellito è un disordine metabolico ad eziologia multipla, caratterizzato da iperglicemia cronica, con alterazioni del metabolismo dei carboidrati, dei grassi e delle proteine, a causa di difetti della secrezione e/o dell'azione dell'insulina<sup>1</sup>. Questa malattia è definita sindrome eterogenea, perché comprende varie forme cliniche, di cui le più importanti sono il diabete mellito di tipo 1 o insulino dipendente (IDDM1 o T1DM), causato da una distruzione autoimmune delle cellule  $\beta^{2,3}$ , ed il diabete mellito di tipo 2 o insulino indipendente (IDDM2 o T2DM) caratterizzato da un deficit parziale di secrezione d'insulina e che s'instaura spesso su una condizione d'insulino-resistenza<sup>4,5</sup>, il diabete gestazionale<sup>6</sup>, che in genere regredisce dopo il parto, e il MODY, una forma genetica ad ereditarietà autosomica dominante. I principali fattori<sup>7</sup> causanti il diabete sono: l'aumento dei casi di obesità, l'aumento dell'età media e dell'aspettativa di vita, lo stile di vita più sedentario, l'aumento dello stress e soprattutto, la genetica. Attualmente in Italia<sup>8,9</sup> a 3 milioni di persone (4,9% della popolazione) è stato diagnosticato il tipo 2 e si stima che 1 milione di persone

---

<sup>1</sup> M. Soucek. Metabolic syndrome; Vnitr Lek 2009, 55:618-621

<sup>2</sup> Gero L., Type 1 diabetes mellitus: pathogenesis, symptoms and therapy. Orvb Hetil, 2010, 151((13):533-9. Review

<sup>3</sup> Goldberg E and Krause I. Infection and type 1 diabetes mellitus - a two edged sword? Autoimmun Rev., 8(8):682-6, 2009

<sup>4</sup> Kashyap, S. R., & DeFronzo, R. A. (2007). The insulin resistance syndrome: physiological considerations. Diab Vasc Dis Res., 4(1):13-9

<sup>5</sup> S. Brunton. Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder. Postgrad Med, 121:68-81, 2009

<sup>6</sup> American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus (Position Statement). Diabetes Care 2004, 27: S88-S90.

<sup>7</sup> Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature 2001;414:782-7

<sup>8</sup> American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2006;29 (suppl 1):S43:8.

<sup>9</sup> American Diabetes Association. Classification of diabetes. Diabetes 2001 Vital Statistics 5-8.

siano affette, ma prive di una diagnosi (1,6% della popolazione); mentre 2,6 milioni di persone (4,3% della popolazione) hanno difficoltà a mantenere sotto controllo la glicemia, condizione che nella maggior parte dei casi preannuncia lo sviluppo del diabete di tipo 2. Dunque il 9,2% della popolazione italiana ha problemi legati alla glicemia e si prevede che nel 2030 le persone con diabete di tipo 2 diagnosticato saliranno a 5 milioni, e nel mondo arriveranno a 438 milioni. (fonte Diabete Italia). L'organo colpito è il pancreas, in particolare la parte endocrina, le isole di Langerhans, che costituiscono non più dell'1% della massa pancreatica complessiva, e sono popolate da cellule beta secernenti insulina (60-80%), cellule alfa che producono glucagone (20-30%), cellule delta che rilasciano somatostatina (3-10%), la quale modula l'immissione in circolo di glucagone ed insulina, e le cellule F, molto rare (1-2%), secernenti polipeptide pancreatico quando s'ingeriscono cibi essenzialmente proteici. In questi ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sui due ormoni pancreatici, deputati al controllo del tasso glicemico nel sangue: insulina e glucagone. L'insulina<sup>10</sup> è formata da due catene alfa e due beta unite da due ponti disolfuro tra residui di cisteina; ha azione ipoglicemizzante in quanto facilita il passaggio di glucosio dal sangue alle cellule, favorisce l'accumulo di glucosio sottoforma di glicogeno (glicogenosintesi) a livello epatico, ed inibisce la degradazione di glicogeno a glucosio (glicogenolisi). Facilita il passaggio degli aminoacidi dal sangue alle cellule, ha funzione anabolizzante perché stimola la sintesi proteica ed inibisce la neo glucogenesi (formazione di glucosio a partire da alcuni aminoacidi); facilita il passaggio degli acidi grassi dal sangue alle cellule, stimola la sintesi degli acidi grassi a partire da glucosio e aminoacidi in eccesso, ed inibisce la lipolisi (ovvero l'utilizzazione degli acidi grassi a scopo energetico). Inoltre facilita il passaggio di potassio all'interno delle cellule, stimola la proliferazione cellulare, stimola l'uso di glucosio per la produzione di energia e stimola la produzione endogena di colesterolo. Lo stimolo che maggiormente induce l'immissione in circolo d'insulina, è l'iperglicemia. Il glucagone, invece, è un antagonista dell'insulina e con la sua azione promuove la glicogenolisi a livello epatico (produzione di glucosio a partire da glicogeno), inibisce la glicogenosintesi e

---

<sup>10</sup> Scheen, A.J., and Lefebvre, P.J. (1996). Insulin action in man. *Diabetes Metab.* 22, 105–110.

stimola la gluconeogenesi (produzione di glucosio a partire da alcuni aminoacidi). Non stimola la glicogenolisi muscolare, sensibile all'azione dell'adrenalina, ma soltanto quella epatica. Favorisce la sintesi surrenalica di catecolamine ed aumenta la forza di contrazione del cuore. Interviene anche nel metabolismo lipidico, stimolando la mobilitazione degli acidi grassi dal tessuto adiposo, favorendo la loro ossidazione e inibendone la sintesi. Il maggior stimolo per l'azione del glucagone è dato dal digiuno, il che provoca una riduzione dei livelli di glicemia nel sangue, che scendono sotto la soglia di circa 80 - 100 mg/dl.

### **1.1.1 Diabete mellito tipo 2**

Il diabete di tipo 2 è il disordine endocrino-metabolico<sup>11,12</sup> più diffuso nel mondo, colpisce il 5-10% della popolazione dei Paesi industrializzati e rappresenta circa il 90% dei casi di diabete mellito. Secondo valutazioni dell'OMS la crescita annuale del diabete è stimabile intorno al 5-6%. Si manifesta generalmente in età avanzata, per lo più dopo i 40 anni e soprattutto in persone in sovrappeso o obese<sup>13</sup>. Purtroppo però l'incremento dell'obesità e lo stile di vita sedentario, tipici della nostra società, fanno sì che il diabete di tipo 2 insorga anche in bambini e adolescenti, con frequenza sempre maggiore. Le cause alla base dell'insorgenza della malattia vanno ricercate anche in fattori genetici<sup>14</sup>, quali polimorfismi di geni codificanti per fattori di trascrizione e proteine coinvolte nel metabolismo del glucosio, che si ripercuotono sulla funzione e sulla sopravvivenza della beta cellula; in fattori ambientali, come la sedentarietà, l'eccessiva alimentazione che porta a sovrappeso e obesità, ed anche il normale invecchiamento, poiché si accompagna ad una fisiologica riduzione della sensibilità dei tessuti periferici all'insulina. In definitiva il diabete di tipo 2 è

---

<sup>11</sup> Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regul Pept* 2008;146:4-11.

<sup>12</sup> Rhodes CJ. Type 2 diabetes - a matter of beta-cell life and death *Science* 2005;307:380-4

<sup>13</sup> James WP. The fundamental drivers of the obesity epidemic. *Obes Rev* 2008; **9** Suppl 1: 6-13 [PMID: 18307693 DOI: 10.1111/j.1467-789X.2007.00432.x]

<sup>14</sup> Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet.* 2013 Apr;132(4):359-83.

caratterizzato da difetti della  $\beta$ -cellula associati ad alterata secrezione d'insulina<sup>15</sup> e ridotta sensibilità alla sua azione, da parte di tessuti bersaglio, quali muscolo, fegato, e tessuto adiposo (insulino-resistenza)<sup>16,17</sup>. Durante lo sviluppo del diabete di tipo 2 le  $\beta$ -cellule<sup>18</sup> mostrano una riduzione di numero e volume, dovuta ad aumentata morte per fenomeni apoptotici, non compensata da rigenerazione; inoltre le  $\beta$ -cellule non smettono di produrre insulina, anzi si possono notare livelli d'insulinemie ridotti, normali o aumentati, ma sempre insufficienti a garantire una glicemia normale. Ciò espone l'organismo a due importanti conseguenze: la glucotossicità, cioè l'esposizione prolungata ad alte concentrazioni di glucosio, alla quale concorre un'elevata secrezione di glucagone<sup>19</sup>, tipica di questi pazienti, e la lipotossicità, cioè alti livelli di acidi grassi che causano un'eccessiva deposizione di trigliceridi a livello di fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo. La gluco-lipotossicità<sup>20</sup> assume un ruolo centrale nella patologia perché alimenta ed aggrava l'insulina resistenza, causa danni sistemici, aumenta lo stress ossidativo e porta alla morte le  $\beta$ -cellule pancreatiche.

---

<sup>15</sup> Folli F, Okada T, Perego C, Gunton J, Liew CW, Akiyama M, D'Amico A, La Rosa S, Placidi C, Lupi R, Marchetti P, Sesti G, Hellerstein M, Perego L, Kulkarni RN. Altered insulin receptor signalling and  $\beta$ -cell cycle dynamics in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2011;6(11): e28050. Epub 2011 Nov 30. PubMed PMID: 22140505 PubMed Central PMCID: PMC3227614.

<sup>16</sup> Kahn SE. The relative contribution of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003;46:3-19

<sup>17</sup> Soumaya K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes. *Adv Exp Med Biol*. 2012;771:240-51. Review.

<sup>18</sup> Marchetti P, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Marselli L, Boggi U. The beta-cell in human type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol*. 2010;654:501-14. Review. PubMed PMID: 20217512.

<sup>19</sup> Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes* 1987; 36: 274-283

<sup>20</sup> Ohneda A, Watanabe K, Horigome K, Sakai T, Kai Y, Oikawa S. Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:504-10

### 1.1.2. Diabete mellito tipo 1

Il diabete mellito 1 o diabete giovanile è una malattia autoimmune caratterizzata dalla distruzione progressiva delle  $\beta$  cellule pancreatiche<sup>21</sup> delle isole di Langerhans da parte del sistema immunitario, determinando un deficit solitamente totale d'insulina. Il processo autoimmune non è congenito, ma deriva da un'interazione tra una condizione di predisposizione genetica e fattori ambientali non ancora identificati<sup>22</sup>. Questa forma di diabete insorge solitamente nei primi trent'anni di vita, e rappresenta il 10% dei casi, e in oltre la metà di questi si manifesta in età infantile/adolescenziale<sup>23</sup>, con maggiore frequenza nelle popolazioni di razza caucasica. In Italia è stata riscontrata una rilevanza pari a 4-8 casi/100.000 abitanti/anno, anche se ci sono delle eccezioni, come quella della Sardegna<sup>24</sup>, con un'incidenza di diabete di tipo 1 tra le più elevate. Nel paziente affetto da T1DM si verifica una situazione di eccesso di glucosio nel sangue identificata con il nome di iperglicemia. La mancanza o la scarsità d'insulina, quindi, non consente al corpo di utilizzare gli zuccheri introdotti attraverso l'alimentazione che vengono così eliminati con le urine. In questa situazione l'organismo è costretto a produrre energia in altri modi, principalmente attraverso il metabolismo dei grassi, il che comporta la produzione dei cosiddetti corpi chetonici<sup>25</sup>. I fattori che contribuiscono alla sua insorgenza sono genetici (ereditari)<sup>26</sup>, fattori immunitari<sup>27</sup>, acquisiti e fattori ambientali: tuttavia, nei soggetti geneticamente predisposti a sviluppare la malattia devono verificarsi altri

---

<sup>21</sup> Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol.* 2003, 56(1):1-10. Review.

<sup>22</sup> Secrest AM, Costacou T, Gutelius B, Miller RG, Songer TJ, Orchard TJ. Associations Between Socioeconomic Status and Major Complications in Type 1 Diabetes: The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication (EDC) Study. *Ann Epidemiol.* 2011 May;21(5):374-81.

<sup>23</sup> Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia.* 1999, 42(12):1395-403.

<sup>24</sup> Songini M, Lombardo C. The Sardinian way to type 1 diabetes. *J Diabetes Sci Technol.* 2010 Sep 1;4(5):1248-55. Review

<sup>25</sup> Muller WA, Faloona GR, Unger RH. Hyperglucagonemia in diabetic ketoacidosis. Its prevalence and significance. *Am J Med* 1973; 54 : 52-57

<sup>26</sup> Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med.* 2009, 360(16):1646-54. Review.

<sup>27</sup> Csorba TR, Lyon AW, Hollenberg MD. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2010, 47(2):51-71.

eventi<sup>28</sup>, ovvero il verificarsi di fattori immunitari e/o fattori ambientali perché la malattia si sviluppi.

## **1.2 Terapie di gestione del diabete**

Nonostante il diabete mellito sia ancora oggi una malattia incurabile, alcune terapie permettono ai soggetti affetti di condurre uno stile di vita quanto più normale possibile. Infatti la scoperta dell'insulina, nel 1921, ha cambiato la storia della malattia diabetica, trasformandola da acuta e fatale, a cronica, in quanto la vita media di una persona diabetica di tipo 1 era di pochi mesi e la morte sopraggiungeva in seguito a chetoacidosi o infezioni. Nei primi anni dalla sua scoperta, la terapia insulinica, anche se in grado di salvare la vita alle persone diabetiche, non era in grado di proteggerle dallo sviluppo delle complicanze diabetiche. Con la diabetologia moderna si comprese che l'obiettivo di un'adeguata terapia del diabete era di raggiungere livelli glicemici simili al soggetto non diabetico.

### **1.2.1. Terapia per il diabete mellito di tipo 1**

Come detto precedentemente, il T1DM, è causato dalla distruzione totale delle cellule  $\beta$  pancreatiche, da parte dei linfociti T, provocando un aumento incontrollato della glicemia. Dunque nei pazienti T1DM la terapia insulinica sostitutiva<sup>29</sup>, mediante somministrazione esogena dell'ormone, diventa l'unica forma di trattamento per controllare le alterazioni metaboliche acute e la comparsa di complicanze d'organo periferiche. Il compito dell'insulina esogena è quello di simulare il più possibile, l'azione di quella prodotta dall'organismo, sia per quanto riguarda la concentrazione d'insulina basale che di quella rilasciata in acuto dopo i

---

<sup>28</sup> Płaczkiewicz-Jankowska E, Szybiński Z, Huszno B. [Environmental factors in the development of type 1 diabetes -- a new insight]. *Przegl Lek.* 2007, 64(3):175-9. Review

<sup>29</sup> The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 1993; Sep 30; 329 (14):977-86.

pasti, permettendo un normale utilizzo del glucosio da parte delle cellule sia a digiuno che dopo aver mangiato. Nei casi più severi di diabete di tipo 1 si ricorre al trapianto<sup>30</sup> del pancreas in toto, con rilascio d'insulina endogena e normalizzazione sia dei valori della glicemia e di altri importanti prodotti del metabolismo, definiti metaboliti intermedi. Per quei pazienti che, invece, non possono sottoporsi al trapianto, a causa per esempio di problemi cardiovascolari, un'alternativa è il trapianto d'isole pancreatiche<sup>31,32,33</sup>, che consiste nel prelevare dal pancreas di un donatore le  $\beta$ -cellule e trapiantarle nel paziente; dopo un processo di separazione e purificazione vengono impiantate, attraverso un'iniezione, nella vena porta, nel fegato, dove attecchiscono e iniziano a produrre insulina. Per evitare episodi di possibile rigetto, il paziente è trattato con terapia immunosoppressiva.

### **1.2.2. Terapia per il diabete mellito di tipo 2**

Per i pazienti T2DM si prevede, almeno inizialmente, il rispetto di una dieta e la pratica costante di attività fisica, poiché la maggior parte di loro è in sovrappeso o obeso. Se però la sola dieta e l'esercizio fisico, non sono sufficienti a riportare i valori della glicemia a livelli ottimali, i diabetici di tipo 2 vengono sottoposti a trattamento farmacologico, attraverso l'uso d'ipoglicemizzanti orali, che hanno l'effetto di ridurre la concentrazione di glucosio nel sangue, sia favorendone la captazione periferica e inibendo la gluconeogenesi, che stimolando la produzione d'insulina da parte del pancreas. Tra i farmaci antidiabetici di ultima generazione, ci sono gli inibitori alfa-glucosidasi, che inibiscono l'attività dell'omonimo enzima, riducendo così il livello di glucosio nel sangue, e nello

---

<sup>30</sup> Meloche RM. Transplantation for the treatment of type 1 diabetes. *World J Gastroenterol*. 2007, 13(47):6347-55. Review.

<sup>31</sup> Berman A, Pawelec K, Fiedor P. Allogeneic transplantation of isolated islet cells in clinical practice. *Pol Arch Med Wewn*. 2009, 119(5):326-32. Review.

<sup>32</sup> Nano R, Clissi B, Melzi R, Calori G, Maffi P, Antonioli B, Marzorati S, Aldrighetti L, Freschi M, Grochowicki T, Socci C, Secchi A, Di Carlo V, Bonifacio E, Bertuzzi F. Islet isolation for allotransplantation: variables associated with successful islet yield and graft function. *Diabetologia*. 2005, 48(5):906-12

<sup>33</sup> Bertuzzi F, Ricordi C. Prediction of clinical outcome in islet allotransplantation. *Diabetes Care*. 2007, 30(2):410-7. Review.



stesso tempo agiscono potenziando l'azione dell'ormone glucagon-like-peptide 1 (GLP-1)<sup>34,35,36,37</sup>, stimolatore della sintesi d'insulina. Questa molecola, rilasciata dalle cellule L intestinali<sup>38</sup>, è in grado di potenziare la secrezione d'insulina glucosio-stimolata, aumentare la crescita e la sopravvivenza delle cellule  $\beta$  pancreatiche, riducendone l'apoptosi, così da aumentarne la massa complessiva, inibire il rilascio di glucagone da parte delle cellule  $\alpha$  e rallentare lo svuotamento gastrico, riducendo l'assunzione di cibo. Dunque gli effetti antidiabetici di questo ormone, uniti al fatto che il GLP-1 si trovi ridotto nei pazienti con diabete di tipo 2, hanno incrementato l'interesse verso questa incretina<sup>39</sup> come un possibile trattamento proprio per i pazienti colpiti da tale patologia.

### 1.2.3. Terapie future per la cura del diabete

Nonostante siano disponibili diversi trattamenti per la patologia diabetica, come visto in precedenza, questi non sono comunque capaci di offrire lo stesso grado di controllo glicemico che si ritrova nei soggetti sani, e non sono in grado di impedire la progressione delle complicanze associate ai tessuti periferici. Le terapie con cellule staminali<sup>40</sup> per il trattamento del diabete, rappresenta una delle principali linee di ricerca per una cura risolutiva della patologia. Un aiuto

---

<sup>34</sup>Nauck MA, El-Ouaghlidi A, Gabrys B, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Gallwitz B, Schmidt WE, Meier JJ. Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept.* 2004 Nov 15;122(3):209-17.

<sup>35</sup>Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol.* 2003 Feb;17(2):161-71. Review

<sup>36</sup>Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev.* 2008 Dec;60(4):470-512. doi: 10.1124/pr.108.000604. Epub 2008 Dec 12. Review.

<sup>37</sup>Kazafeos K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Aug;93 Suppl 1:S32-6. doi: 10.1016/S0168-8227(11)70011-0. Review.

<sup>38</sup>Gareth E. Lim and Patricia L. Brubaker. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. The View From Within. doi: 10.2337/db06-S020 *Diabetes* December 2006 vol. 55 no. Supplement 2 S70-S77.

<sup>39</sup>Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 1986 Jan;29(1):46-52.

<sup>40</sup>Hans R. Schöler, The Potential of Stem Cells: An Inventory in Nikolaus Knoepffler, Dagmar Schipanski, and Stefan Lorenz Sorgner (a cura di), *Human biotechnology as Social Challenge*, Ashgate Publishing, Ltd, 2007, p. 28, ISBN 978-0-7546-5755-2

potrebbe arrivare dalla terapia rigenerativa<sup>41</sup>, con trattamenti in grado di ricostituire la massa  $\beta$  cellulare, in modo da consentire il ripristino a lungo termine del normale controllo glicemico. Le cellule staminali<sup>42</sup>, che possono essere embrionale, fetali e adulte, rappresentano una fonte ideale di cellule simili alle  $\beta$ -cellule pancreatiche, capaci di auto rinnovarsi, attraverso un meccanismo di divisione asimmetrica, permettendo di ottenere un gran numero di cellule trapiantabili, mantenendo allo stesso tempo, l'abilità di differenziarsi verso il fenotipo desiderato, quando poste nelle opportune condizioni di crescita in coltura. Dunque l'utilizzo di questo tipo di cellule è efficace per la produzione in vitro di cellule insulino-secerenti, le quali possono essere trapiantate in situ, permettendo una ripresa funzionale dell'organo, ed evitando in tal modo la somministrazione di una terapia immunosoppressiva a seguito di un trapianto. Tutti i pazienti affetti sia da diabete di tipo 1<sup>43</sup> che di tipo 2 potrebbero beneficiare di questa terapia rigenerativa per ripristinare le proprie  $\beta$ -cellule.

### **1.3. Betatrofina: un nuovo ormone che controlla la proliferazione delle $\beta$ -cellule**

Come detto precedentemente, il diabete è il risultato di una disfunzione del metabolismo dei carboidrati e dei grassi, causato da difetti della secrezione e/o dell'azione dell'insulina. La prevalenza di questa patologia è stimata al 2,8% a livello mondiale e si prevede un aumento al 4,4% dal 2030<sup>44</sup>. Circa il 10% dei diabetici negli Stati Uniti sono di tipo 1, ma la maggior parte sono di tipo 2. Nonostante le due tipologie di diabete abbiano cause primarie diverse, entrambe

---

<sup>41</sup> Regenerative Medicine Glossary in Regenerative Medicine, vol. 4, 4s, luglio 2009, pp. S30 Section 3.44, DOI:10.2217/rme.09.s1, PMID 19604041

<sup>42</sup> James Byrne, The definition and etymology of the word pluripotency in eJournal of Cellular Biotechnology, 1:eP2, 29 giugno 2011.

<sup>43</sup> Voltarelli JC, Couri CE, Rodrigues MC, Moraes DA, Stracieri AB, Pieroni F, Navarro G, Leal AM, Simões BP. Stem cell therapies for type 1 diabetes mellitus.

<sup>44</sup> Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 27, 1047–1053.

potrebbero beneficiare di trattamenti volti a ricostituire la massa delle  $\beta$ -cellule<sup>45</sup>, per garantire un controllo glicemico normale a lungo termine. I meccanismi genetici che controllano la proliferazione delle cellule endocrine insulino-secrnenti non sono ancora del tutto stati spiegati: si sa, però, che i regolatori del ciclo-cellulare D1/D2 e CDK4<sup>46</sup> promuovono la proliferazione  $\beta$ -cellulare, così come i fattori di trascrizione E2F1/2; al contrario, inibitori del ciclo cellulare, inclusi p15<sup>lnk4b</sup>, p18<sup>lnk4c</sup> e p27<sup>kip1</sup>,<sup>47</sup> reprimono la replicazione delle  $\beta$ -cellule. Oltre ai fattori elencati, espressi nelle  $\beta$ -cellule stesse, sono presenti altri fattori, circolanti o sistemici, che sono in grado di regolare la proliferazione della massa  $\beta$ -cellulare. Il glucosio stesso è un mitogeno delle cellule  $\beta$ ; infatti, l'infusione di glucosio nei roditori provoca un lieve aumento della replicazione della  $\beta$ -cellula<sup>48,49</sup>, mentre mutazioni a livello del gene che controlla la sintesi della glucocinasi ne diminuiscono in modo significativo la proliferazione<sup>50</sup>. Inoltre, la delezione genetica dello stesso enzima può ridurre i tassi di replicazione cellulare, mentre l'attivazione farmacologica ne aumenta di 2 volte la proliferazione. Diversi ormoni, tra cui l'insulina, il lattogeno placentare<sup>51</sup> e la prolattina, svolgono un ruolo nella regolazione delle  $\beta$ -cellule; l'ormone incretina glucagone-like peptide 1 (GLP-1)<sup>52</sup> e il peptide glucosio-dipendente insulintropico peptide

<sup>45</sup> Meier, J.J., Butler, A.E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2008). Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57, 1584–1594.

<sup>46</sup> Kushner, J.A., Cierny, M.A., Sicinska, E., Wartschow, L.M., Teta, M., Long, S.Y., Sicinski, P., and White, M.F. (2005). Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3752–3762.

<sup>47</sup> Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R., Marti'n, J., Ortega, S., Marti'n-Caballero, J., Flores, J.M., Cordo'n-Cardo, C., and Barbacid, M. (2000). Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J.* 19, 3496–3506.

<sup>48</sup> Paris, M., Bernard-Kargar, C., Berthault, M.F., Bouwens, L., and Ktorza, A. (2003). Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology* 144, 2717–2727.

<sup>49</sup> Porat, S., Weinberg-Corem, N., Tornovsky-Babaey, S., Schyr-Ben-Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Dadon, D., Granot, Z., Ben-Hur, V., White, P., et al. (2011). Control of pancreatic  $\beta$  cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab.* 13, 440–449.

<sup>50</sup> Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., et al. (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory  $\beta$  cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 117, 246–257.

<sup>51</sup> Parsons, J.A., Brelje, T.C., and Sorenson, R.L. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130, 1459–1466.

<sup>52</sup> Wang, Q., and Brubaker, P.L. (2002). Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 45, 1263–1273

(GIP), aumentano la secrezione d'insulina e promuovono la replicazione delle  $\beta$ -cellule<sup>53</sup>. Allo stesso modo, l'espressione di una chinasi MEK1, costitutivamente attiva nel fegato di topo, aumenta il tasso di replicazione delle  $\beta$ -cellule e migliora la tolleranza al glucosio in modelli animali diabetici, attraverso un meccanismo d'innervazione-dipendente<sup>54</sup>.

Recentemente è stato osservato che in modelli murini d'insulino-resistenza ed obesità, come la carenza di leptina nei topi ob/ob<sup>55</sup> c'è un apparente aumento della massa pancreatica. Tale incremento ha riaperto la ricerca di un fattore sistemico che potrebbe controllare la proliferazione  $\beta$ -cellulare. La prova più forte, a favore di un fattore putativo, prodotto dal fegato e rilasciato in circolo<sup>56,57</sup>, è stata osservata per la prima volta nel laboratorio di Ronald Kahn. Utilizzando topi knockout per recettori dell'insulina fegato-specifici (LIRKO), tali autori hanno riportato l'induzione di un fattore coinvolto nel rapporto tra fegato e isole pancreatiche, per la differenziazione  $\beta$ -cellulare. Successivamente, El Quaamari et al.<sup>58</sup> applicò le tecniche di parabiosi, con il trapianto di tessuti e la cultura in vitro d'isole di Langerhans nei topi LIRKO, per fornire ulteriori elementi di prova dell'esistenza di un fattore non neurale e non cellula-autonomo, in grado di indurre la proliferazione della cellula pancreatica. Era stato sospettato da qualche tempo che, il fegato di animali obesi, suscitasse una migliore attivazione della MAP-chinasi (MAPK). Per verificarne il coinvolgimento, Imai et al<sup>59</sup>. hanno espresso una chinasi regolata e costitutivamente attiva nel fegato dei topi (ca-

<sup>53</sup> Drucker, D.J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 3, 153–165

<sup>54</sup> Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Suzuki, T., Kudo, H., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Kaneko, K., et al. (2008). Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322, 1250–1254.

<sup>55</sup> Tomita, T., Doull, V., Pollock, H.G., and Krizsan, D. (1992). Pancreatic islets of obese hyperglycemic mice (ob/ob). *Pancreas* 7, 367–375.

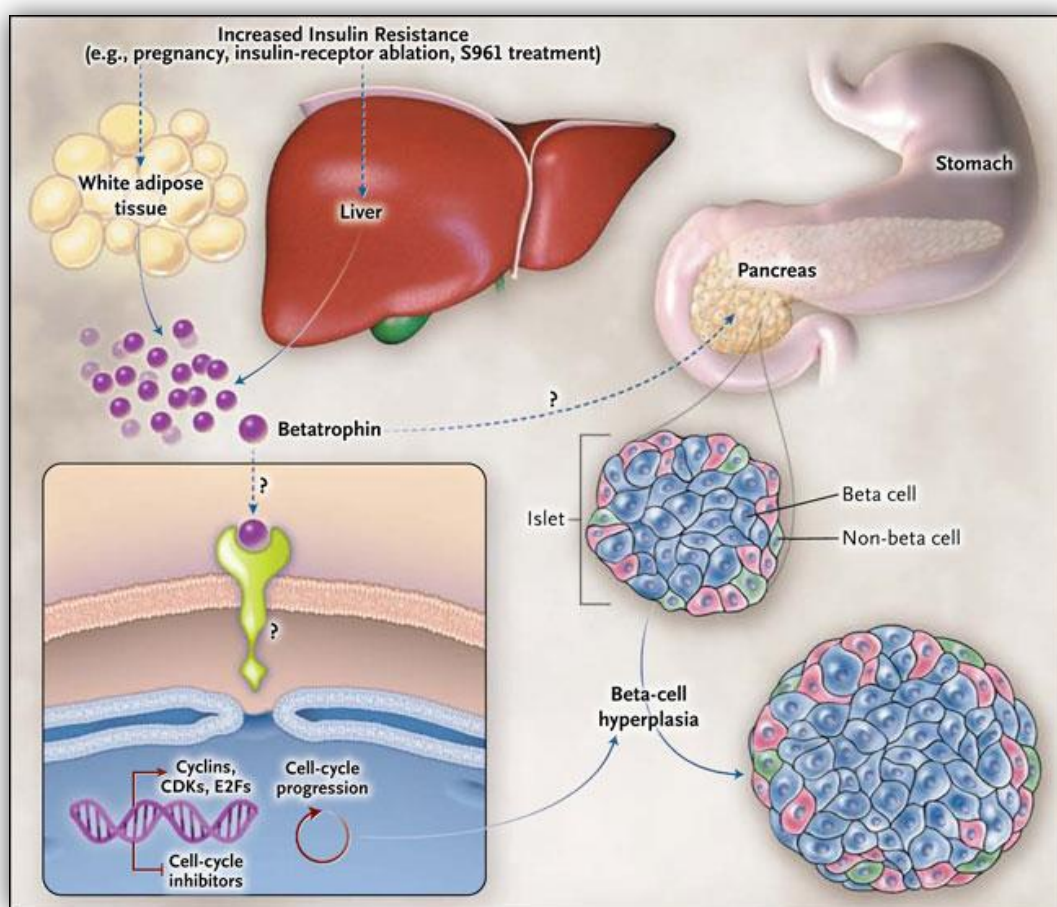
<sup>56</sup> El Ouaamari A, Kawamori D, Dirice E, Liew CW, Shadrach JL, Hu J, Katsuta H, Hollister-Lock J, Qian WJ, Wagers AJ, Kulkarni RN. Liver-derived systemic factors drive  $\beta$  cell hyperplasia in insulin-resistant states. *Cell Rep* 2013; 3: 401-410 [PMID: 23375376 DOI: 10.1016/j.celrep.2013.01.007]

<sup>57</sup> Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Nijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y. Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 2008; 322: 1250-1254 [PMID: 19023081 DOI: 10.1126/science.1163971]

<sup>58</sup> El Ouaamari, A., Kawamori, D., Dirice, E., Liew, C.W., Shadrach, J.L., Hu, J., Katsuta, H., Hollister-Lock, J., Qian, W.J., Wagers, A.J., and Kulkarni, R.N. (2013). Liver-derived systemic factors drive  $\beta$  cell hyperplasia in insulin-resistant states. *Cell Rep* 3, 401–410.

<sup>59</sup> Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Suzuki, T., Kudo, H., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Kaneko, K., et al. (2008). Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322, 1250–1254.

ERK): coerentemente con la loro ipotesi, è stato visto che ERK nel fegato induce un segnale metabolico obesità-associato che viene trasmesso via circuiti neuronali per stimolare la proliferazione  $\beta$ -cellulare. Successivamente, Yi et al<sup>60</sup>, ispirati dallo studio di LIRKO e ca-ERK nei topi, hanno messo in atto una ricerca per un fattore di crescita  $\beta$ -cellulare di derivazione epatica, negli stati d'insulina resistenza.



**Figura 1.** Aumento del numero delle  $\beta$  cellule dovuto all'azione della betatrofina.

Fonte: [www.salvanet.cl](http://www.salvanet.cl)

Gli autori hanno iniziato cooptando un modello, precedentemente descritto, di insulina resistenza nei topi, causato dall'infusione di S961, un antagonista

<sup>60</sup> Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2013; 153: 747-758.

peptidico del recettore dell'insulina<sup>61</sup>. S961 è un peptide di 43aa, che lega il recettore dell'insulina e antagonizza il segnale insulinico sia in vitro che in vivo nei ratti; sono state utilizzate pompe osmotiche per infondere, nei topi adulti, varie dosi di S961. I dati dimostrano che la presenza del peptide S961<sup>62</sup> provoca un'iperglicemia dose-dipendente; una dose elevata di S961 infuso per una settimana, rende i topi glucosio intolleranti, coerentemente con il fatto che blocca il recettore insulinico. Per verificare se questo indica una proliferazione  $\beta$ -cellulare, come si è visto in altri modelli animali, il tasso di proliferazione della  $\beta$ -cellula è stato analizzato misurando l'espressione della Ki67 e valutando la presenza d'insulina con l'immunofluorescenza per tutti i gruppi di dosaggio, dopo trattamento S961. I risultati dello studio mostrano un aumento della  $\beta$ -proliferazione che è sia immediata sia dose-dipendente. Tale proliferazione è stata confermata mediante immunocolorazione con un marker nucleare delle  $\beta$ -cellule (NKX6) e un differente marcatore di divisione cellulare (PCNA). La PCR quantitativa dei regolatori del ciclo cellulare mostra che, in isole pancreatiche, dopo il trattamento con S961, il livello di espressione delle cicline e dei fattori di trascrizione aumenta, mentre diminuisce l'espressione degli inibitori del ciclo cellulare. Alla dose massima testata, nel trattamento con S961, si ha un aumento di 12 volte della replicazione  $\beta$ -cellulare, che influenza tutte le isole pancreatiche ugualmente, portando ad un aumento della superficie totale delle cellule  $\beta$ . È stato ipotizzato che S961 agisce indirettamente sulle cellule  $\beta$  e sull'espressione genica nei tessuti coinvolti nella regolazione del metabolismo (fegato, grasso bianco, muscolo scheletrico), e sul pancreas, per identificare potenziali mediatori di tale proliferazione.

L'analisi microarray indicò un gene che fu definito *betatrofina*<sup>63</sup>, anche detto da altri ricercatori, *lipasina*<sup>64</sup>, *angiopoietina-8*<sup>65</sup> e *RIFL*<sup>66</sup>; tale molecola è

---

<sup>61</sup> Schäffer L, Brand CL, Hansen BF, Ribel U, Shaw AC, Slaaby R, Sturis J. A novel high-affinity peptide antagonist to the insulin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: 380-383 [PMID: 18782558 DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.08.151]

<sup>62</sup> Vikram, A.; Jena, G. S961, an insulin receptor antagonist causes hyperinsulinemia, insulin-resistance and depletion of energy stores in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 398, 260–265.

<sup>63</sup> Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2013; 153: 747-758 [PMID: 23623304 DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.008]

sopraregolata nel fegato trattato con S961 (di circa 4 volte) e nel tessuto adiposo bianco (di circa 3 volte), mentre la sua espressione è invariata nel muscolo scheletrico e nelle cellule  $\beta$  stesse, in risposta a S961. Il gene della betatrofina codifica una proteina di 198 amminoacidi (il gene del topo è stato annotato come Gm6484, posizionato sul cromosoma 9, mentre il gene umano è noto come C19orf80, sul cromosoma 19p13.2, un locus associato alle lipoproteine ad alta densità, HDL)<sup>67</sup>. Inoltre, il gene del recettore della lipoproteina a bassa densità (LDLR) è situato in prossimità del gene della betatrofina (una distanza di circa 150 kb sia nell'uomo che nel topo): ciò sottolinea l'associazione tra il locus 19p13.2 e i livelli di HDL nel plasma. Il gene ha 4 esoni e giace entro l'introne di un altro gene DOCK6. L'mRNA della betatrofina negli esseri umani è primariamente espresso nel fegato, dove i suoi livelli sono alti, maggiori di quelli riscontrati in altri tessuti<sup>68</sup>. La betatrofina, e i suoi omologhi, sono stati rilevati solo nei mammiferi, ciò suggerisce un ruolo fisiologico dell'ormone nel contribuire alle caratteristiche tipiche dei mammiferi, quali gravidanza, allattamento ed omeotermia. Il paralogo più vicino è l'angiopoietina-3 (ANGPTL-3) che condivide il 22% di proteine identiche. Il gene dell'ANGPTL-3 è incorporato sul filamento del gene DOCK7, sul cromosoma 1; le strutture genetiche analoghe suggeriscono che la betatrofina e l'angiopoietina-3 sono derivate dalla duplicazione del gene ancestrale DOCK. Le analisi della sequenza hanno rivelato che la regione N-terminale (1-20 aa) della betatrofina contiene sequenze segnali per essere secreta o legata alla membrana. Inoltre, sono presenti diversi siti di modificazione delle proteine nella regione N-terminale, tra i quali, tre siti di N-mirystoylation, il che implica che la betatrofina lipidata è lipofila e

---

<sup>64</sup> Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424: 786-792 [PMID: 22809513 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.038]

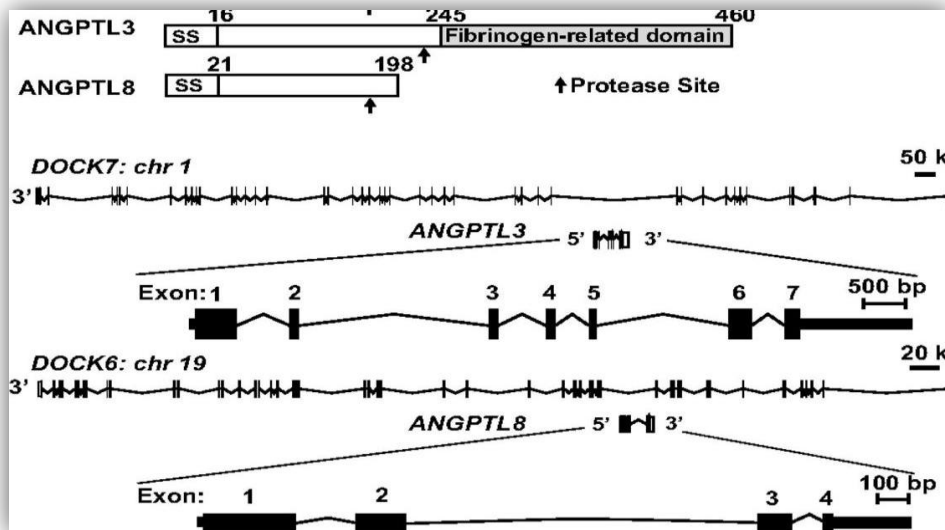
<sup>65</sup> Mattijssen F, Kersten S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821: 782-789 [PMID: 22063269 DOI: 10.1016/j.bbalip.2011.10.010]

<sup>66</sup> Ren, G., Kim, J.Y., and Smas, C.M. (2012). Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E334–E351.

<sup>67</sup> Tseng, Y.H.; Ke, P.Y.; Liao, C.J.; Wu, S.M.; Chi, H.C.; Tsai, C.Y.; Chen, C.Y.; Lin, Y.H.; Lin, K.H. Chromosome 19 open reading frame 80 is upregulated by thyroid hormone and modulates autophagy and lipid metabolism. *Autophagy* 2014, 10, 20–31.

<sup>68</sup> Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2013; 153: 747-758

può essere fissata alla struttura della membrana. Questi siti appaiono altamente conservati attraverso la specie, in particolare le sequenze all'estremità C-terminale.



**Figura 2.** Localizzazione cromosomica e struttura dell'ANGPTL-8 e ANGPTL-3.  
Fonte: Quagliarini F. et al. (2012). *Proc Natl Acad Sci USA* 109(48):19751–19756.

L'infusione dell'antagonista del recettore insulinico S961, che provoca proliferazione  $\beta$ -cellulare, porta ad una sovra regolazione di 6 volte di betatrofina nel fegato e di 4 volte nel tessuto adiposo bianco: inoltre, l'mRNA della batatrofina aumenta anche nel fegato di topo ob/ob, e i tassi di replicazione delle  $\beta$  cellule incrementano durante la gravidanza. Le analisi della sequenza della betatrofina del topo e di quella umana, mostra un segnale di secrezione previsto in posizione N terminale e due domini *coiled-coil*.

La betatrofina può essere rilevata nel plasma umano, dimostrando che è una proteina secreta in vivo. L'espressione di questo ormone nel fegato induce una specifica proliferazione delle  $\beta$ -cellule e migliora la tolleranza al glucosio nei topi. Infatti, dopo l'iniezione idrodinamica di betatrofina, il 5-10% delle cellule epatiche esprime l'ormone, ed il tasso di proliferazione  $\beta$ -cellulare è, di circa, il 4,6%, 17 volte maggiore di quello nei topi di controllo. Questo aumento porta ad



una significativa espansione del numero e della massa  $\beta$ -cellulare. Per valutare la funzione delle  $\beta$ -cellule, sono state isolate isole pancreatiche di topi iniettati con betatrofina ed eseguita un'analisi di secrezione insulinica glucosio-stimolata (GSIS): il risultato è che la GSIS d'isole pancreatiche di topi iniettati con l'ormone è indistinguibile da quella dei topi non iniettati, suggerendo che la normale funzione delle cellule  $\beta$  era mantenuta nei topi iniettati con betatrofina, dopo proliferazione cellulare. Inoltre un test di tolleranza al glucosio è stato eseguito in topi con e senza iniezione di betatrofina: i dati dimostrano, che i topi, betatrofina-iniettati, tenuti a digiuno per 6 h prima dell'iniezione di glucosio, hanno un livello di questo zucchero a digiuno minore e una migliore tolleranza ad esso, rispetto ai topi senza iniezione dell'ormone. L'espressione della betatrofina comporta anche un aumento minore dei livelli d'insulina plasmatica a digiuno, e promuove la replicazione  $\beta$ -cellulare senza insulino-resistenza.

### **1.3.1. La betatrofina e il metabolismo dei trigliceridi**

La definizione della betatrofina con altri tre nomi è dovuta alle sue specifiche funzioni; RIFL<sup>69</sup> (ri-alimentazione indotta grasso e fegato), segnalato come un gene con un ruolo nel metabolismo dei lipidi, che portò successivamente Zhang a denominarla lipasina 5<sup>70</sup>, come inibitore della lipoproteina lipasi, coinvolta nella regolazione dei livelli di trigliceridi sierici. Infine, Quagliarini, la caratterizzò con il nome di angiopoietina-8<sup>71,72</sup>, proteina per regolare i grassi post-prandiali nel metabolismo degli acidi, associata all'angiopoietina-3. L'angiopoietina-8 (ANGPTL-8) è un membro atipico della famiglia delle angiopoietine, implicata nel metabolismo dei trigliceridi e del glucosio. La sovraespressione epatica dell'ANGPTL-8 provoca ipertrigliceridemia ed aumento

<sup>69</sup> Ren, G.; Kim, J.Y.; Smas, C.M. Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012, 303, E334–E351

<sup>70</sup> Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liverenriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424: 786-792 [PMID: 22809513 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.038]

<sup>71</sup> Mattijssen F, Kersten S (2012) Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietinlike proteins. *Biochim Biophys Acta* 1821(5):782–789.

<sup>72</sup> Quagliarini F, et al. (2012) Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(48):19751–19756

della secrezione insulinica. Quagliarini<sup>73</sup> ha riportato che il gene Gm6484 si trova nel corrispondente introne del DOCK6, e il prodotto risultante, noto appunto ANGPTL-8, è un paralogo dell'angiopoietina-3 (ANGPTL-3), un gene localizzato in un introne di DOCK7, coinvolto nell'omeostasi lipidica. Come dimostrato in precedenza, l'ANGPTL-8 è principalmente espressa nel fegato, tessuto adiposo e nel plasma degli esseri umani; è marcatamente sovra regolata dall'alimentazione e soppressa dal digiuno, sia nei topi che nell'uomo. La famiglia delle angiopoietine comprende 7 membri; tutti hanno uno o due domini coiled-coil ed un dominio di fibrinogeno-simile al C-terminale, che non esistono nell'ANGPTL-8, così come siti di glicosilazione e amminoacidi per stabilire ponti disolfuro, presenti in tutte le altre angiopoietine. Tali caratteristiche suggeriscono che l'ANGPTL-8 è un atipico membro nella famiglia delle angiopoietine. Per quanto riguarda le somiglianze, i residui nel dominio N-terminale, nell'angiopoietina3 e 4<sup>74,75</sup>, sono conservati nell'angiopoietina-8, così come il glutammato al residuo 40, presente sia nell'ANGPTL-4 che nella 8, il quale è richiesto per l'inibizione della lipoproteina lipasi, contribuendo in tal modo, alla regolazione dei trigliceridi nel plasma. Per valutare l'associazione funzionale tra i due membri della famiglia, ANGPTL-3 e 8, Quagliarini<sup>76</sup>, ha espresso ANGPTL-3 a vari livelli, con o senza ANGPTL-8 nel fegato dei topi. Come già suggerito, l'ANGPTL-8 interagisce con l'ANGPTL-3, promuovendo la scissione di quest'ultima, un processo che aumenterebbe l'attività dell'ANGPTL-8 e contemporaneamente diminuirebbe la quantità dell'angiopoietina-3; la coespressione dell'angiopoietina-3 con l'angiopoietina-8 porta alla comparsa di una banda di circa 33 kDa, corrispondente al dominio N-terminale dell'ANGPTL-3, i dati ottenuti sono coerenti con un modello in cui ANGPTL-8 attiva l'ANGPTL-3, legandosi al suo

---

<sup>73</sup> Quagliarini, F.; Wang, Y.; Kozlitina, J.; Grishin, N.V.; Hyde, R.; Boerwinkle, E.; Valenzuela, D.M.; Murphy, A.J.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 19751–19756.

<sup>74</sup> Lee EC, et al. (2009) Identification of a new functional domain in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) and angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) involved in binding and inhibition of lipoprotein lipase (LPL). *J Biol Chem* 284(20):13735–13745.

<sup>75</sup> Ono M, et al. (2003) Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. *J Biol Chem* 278(43):41804–41809.

<sup>76</sup> Quagliarini, F.; Wang, Y.; Kozlitina, J.; Grishin, N.V.; Hyde, R.; Boerwinkle, E.; Valenzuela, D.M. Murphy, A.J.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 19751–19756.

dominio N-terminale, e promuovendone la sua scissione, forse cambiando la conformazione dell'angiopoietina-3, per rendere il sito di taglio più accessibile, o con l'assunzione di una proteasi associata alle cellule epatiche; a seguito della scissione, ANGPTL-8 rimane legata al dominio N-terminale di ANGPTL-3, e può far parte di un complesso attivo che dirige il traffico dei lipidi tra i tessuti. L'interazione tra ANGPTL-8 e ANGPTL-3 sembra anche promuovere l'uscita di quest'ultima proteina dalla circolazione. Dunque, questi dati suggeriscono che l'angiopoietina-8, un paralogo dell'angiopoietina-3, regola il metabolismo degli acidi grassi e trigliceridi, in risposta all'assunzione di cibo controllando l'attivazione del suo progenitore, ANGPTL-3.

L'obiettivo primario dello studio è stato quello di valutare l'effetto dell'ANGPTL-8 sul metabolismo lipidico e glucidico utilizzando i topi knockout del gene ANGPTL-8<sup>77</sup>. L'inattivazione dell'ANGPTL-8 interrompe il metabolismo dei trigliceridi circolanti e causa una riduzione della massa del tessuto adiposo, che peggiora con l'età. I livelli plasmatici dei trigliceridi nei topi knockout erano paragonabili a quelli dei topi wilde-type a digiuno, ma erano ridotti più del 50% negli animali alimentati. La diminuzione dei trigliceridi circolanti nel plasma rifletteva alterazioni sia nella produzione che nell'eliminazione degli stessi trigliceridi: la secrezione delle VLDL era marcatamente ridotta, mentre l'attività della LPL e la clearance dei chilomicroni-trigliceridi erano significativamente aumentate nei topi knockout; mentre, la misura diretta delle VLDL-acidi grassi assorbiti dal tessuto adiposo e dal cuore, rivela differenze sostanziali tra topi wilde-type e knockout, a stomaco pieno. L'aumento postprandiale dell'assorbimento delle VLDL-acidi grassi, da parte del tessuto adiposo, osservato nei topi wilde-type, è invece abolito nei topi knockout. Questi dati, dunque, rivelano che l'ANGPTL-8 gioca un ruolo importante nel reintegro dei trigliceridi al tessuto adiposo, dopo il digiuno. La sintesi di VLDL alterata e una maggiore attività della LPL, nel plasma postprandiale di topi knockout, suggeriscono che l'ANGPTL-8 promuove il passaggio dei trigliceridi al

---

<sup>77</sup>Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, Gromada J, Valenzuela DM, Cohen JC, Hobbs HH. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 1;110(40):16109-14. doi: 10.1073/pnas.1315292110.

tessuto adiposo, aumentando la secrezione epatica delle VLDL, e inibendo l'attività della LPL nei tessuti ossidativi. Nei topi wilde-type, l'alimentazione riduce l'attività della LPL nel cuore, ed aumenta l'attività dell'enzima nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo. Un continuo assorbimento di trigliceridi dai tessuti ossidativi, come avviene nei topi transgenici, che sovra esprimono LPL nel muscolo scheletrico, limita la disponibilità di assorbimento dei trigliceridi per il tessuto adiposo. L'attività costante della LPL nei tessuti ossidativi porta come effetto una ridotta funzionalità epatica, e può abrogare l'assorbimento delle VLDL-trigliceridi da parte del tessuto adiposo, nei topi knockout. Di conseguenza, il tessuto adiposo non è adeguatamente fornito dopo il digiuno, in questi animali, e quindi non riescono ad accumulare grasso man mano che invecchiano. Garcia-Arcos e collaboratori<sup>78</sup> hanno dimostrato che l'inattivazione della LPL nel tessuto adiposo bianco, non riduce significativamente la massa del tessuto adiposo nei topi, a meno che i topi sovra esprimono contemporaneamente LPL nel muscolo. Mentre, l'ANGPTL-8 può avere diversi effetti sulla attività della LPL sia nel tessuto adiposo che in quello muscolare, tali dati suggeriscono che la soppressione della LPL nei tessuti ossidativi è essenziale per l'accrescimento di grasso negli animali. Questi dati supportano dei modelli in cui ANGPTL-8, insieme alle ANGPTL-3 e 4, coordina il traffico dei trigliceridi e acidi grassi, in risposta alla variazione diurna dell'assunzione di cibo. Le tre proteine agiscono sulla stessa via metabolica, ma in direzioni opposte ed in diverse fasi del ciclo metabolico. I bassi livelli plasmatici dei trigliceridi, e gli elevati livelli della LPL nei topi knockout ANGPTL-8, sono simili al fenotipo dei topi knockout ANGPTL-3, a testimonianza che le due proteine agiscono insieme. Studi dimostrano che omozigoti umani per la perdita di funzione in seguito a mutazioni nell'ANGPTL-3, hanno ridotto i livelli plasmatici di colesterolo e trigliceridi. Mentre la variazione genetica nell'ANGPTL-8 è associata a cambiamenti modesti nei livelli dei lipidi plasmatici. Tuttavia, a bassi livelli plasmatici di trigliceridi, e la riduzione del tessuto adiposo, con la massa magra conservata nei topi knockout ANGPTL-8, pone nell'ANGPTL-8 un obiettivo terapeutico potenzialmente attraente per le dislipidemie e possibilmente

---

<sup>78</sup> Garcia-Arcos I, et al. (2013) Adipose-specific lipoprotein lipase deficiency more profoundly affects brown than white fat biology. *J Biol Chem* 288(20):14046–14058.

per l'obesità. La scoperta che i livelli di trigliceridi sono anche più bassi nei topi eterozigoti, suggerisce che l'inibizione anche parziale dell'ANGPTL-8 può fornire un beneficio terapeutico.

Un altro studio, quello di Zhang, identificò il gene Gm6484, con il nome di lipasina<sup>79</sup>, a causa dell'inibizione dell'attività della LPL. La lipoproteina lipasi è un enzima chiave nel metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi, quali chilomicroni, di origine intestinale, e VLDL, di origine epatica, generando di-e mono-gliceridi, acidi grassi liberi, e lipoproteine a densità intermedia<sup>80</sup>. È espressa in diversi tessuti (adiposo, muscolare, cardiaco) e la sua regolazione è specifica per ognuno di essi, tanto che l'espressione della LPL si correla con il bisogno e la captazione dei lipidi, da parte dei tessuti (regolazione tessuto-specifica)<sup>81,82</sup>. In fase post-prandiale, la LPL è attiva nel tessuto adiposo mentre è inattiva nel tessuto muscolare e nel muscolo cardiaco. A digiuno, invece, la situazione è inversa: infatti, l'attività della LPL aumenta nel tessuto muscolare e in quello cardiaco, e diminuisce nel tessuto adiposo<sup>83</sup>. L'aumento dell'attività della lipasi a cui si assiste nel tessuto adiposo nel periodo post-prandiale, è da associarsi all'aumentata secrezione insulinica che si ha in seguito a un apporto di alimenti. In esperimenti a breve termine, condotti sui ratti, pasti ricchi di grassi hanno determinato un aumento dell'attività della LPL del tessuto adiposo<sup>84</sup>, ma in misura minore rispetto ad un pasto ricco di carboidrati; nell'uomo l'effetto acuto di un carico di glucosio, sull'attività della lipasi del tessuto adiposo, ha indotto un rapido aumento dell'attività dell'enzima, mentre la somministrazione di olio non ha determinato nessuna variazione significativa dell'attività della LPL.

---

<sup>79</sup> Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992;29:243-68.

<sup>80</sup> Osborne JC Jr, Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS, Olivecrona T. Studies on activation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 1985;24:5606-11.

<sup>81</sup> Cryer A. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *Int J Biochem* 1981;13:525-41.

<sup>82</sup> Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim Biophys Acta* 1970;210:473-82.

<sup>83</sup> Lithell H, Boberg J, Hellsing K, Lundqvist G, Vessby B. Lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states. *Atherosclerosis* 1978;30:89-94.

<sup>84</sup> Wing DR, Salalman MR, Robinson DS. Clearing-factor lipase in adipose tissue. Factors influencing the increase in enzyme activity produced on incubation of tissue from starved rats in vitro. *Biochem J* 1966;99:648-56.

L'insulina<sup>85</sup> è, dunque, uno dei più potenti regolatori della lipoproteina lipasi; il preciso meccanismo attraverso cui l'ormone stimola l'enzima, non è ancora del tutto chiaro, ma sembrerebbe influenzare tutte le fasi implicate nell'espressione dell'attività della lipoproteina lipasi. Mentre ormoni, quali l'adrenalina, la noradrenalina e gli estrogeni<sup>86,87</sup>, sembrano essere responsabili di una diminuzione dell'attività della LPL, inattivando l'enzima prima del suo rilascio all'adipocita.

Alcuni studi hanno dimostrato che in pazienti con diabete di tipo 1 e tipo 2, l'attività catalitica della LPL è ridotta sia nel plasma e sia nel tessuto adiposo; inoltre, successivi trattamenti di questi pazienti con insulina, e con farmaci in grado di migliorare il controllo glicemico, inducono un aumento dell'attività della LPL, con conseguente riduzione dei trigliceridi plasmatici. Per quanto riguarda il diabete, questi studi, suggerirebbero che anche l'iperglicemia, e l'insulino-resistenza nel tipo 2, possono avere una certa influenza sull'attività dell'enzima, riducendo entrambe l'attività della lipoproteina lipasi a livello del tessuto adiposo.

### **1.3.2. Betatrofina e diabete**

Nonostante un'intensa attività di ricerca, non vi è ancora alcun trattamento disponibile per prevenire la perdita di  $\beta$ -cellule nel diabete di tipo 1. All'insorgere della malattia, circa il 30-40% delle cellule  $\beta$  rimangono, avendo in questo modo la funzione delle cellule residue per diversi anni. Dunque, la betatrofina, essendo stata descritta come un potente stimolatore della proliferazione  $\beta$ -cellulare, potrebbe aprire la possibilità a trattamenti futuri per il diabete di tipo 1. Per la prima volta, in uno studio pubblicato nel 2013<sup>88</sup>, sono state valutate le concentrazioni della betatrofina nel plasma umano, risultando che le concentrazioni circolanti di ormone sono aumentate nel diabete di tipo 1, in

---

<sup>85</sup> Ashby P, Robinson DS. Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipase. *Biochem J* 1980;188:185-92

<sup>86</sup> Hamosh M, Hamosh P. The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest* 1975;55:1132-5.

<sup>87</sup> Price TM, O'Brien SN, Welter BH, George R, Anandjiwala J, Kilgore M. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase: possible mechanism of body fat distribution. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:101-7

<sup>88</sup> Espes D, Lau J and Carlsson PO: Increased circulating levels of betatrophin in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetologia* 57: 50-53, 2014

contrasto con quanto detto precedentemente in un modello di topo insulino-deficiente. Ciò indica la presenza di un potenziale stimolo per la proliferazione delle  $\beta$ -cellule nel diabete di tipo 1, ma che non è comunque sufficiente a compensare il calo dei livelli del C-peptide. Le concentrazioni della betatrofina erano normalmente circa 300 pg/ml, ma il doppio approssimativamente nei pazienti con diabete di tipo 1. In questi pazienti non c'erano correlazioni tra betatrofina ed età, BMI, lipidi nel sangue, glucosio o fabbisogno d'insulina, mentre nei controlli, i livelli di betatrofina aumentavano con l'età. BMI, trigliceridi, e livelli di HDL e LDL, erano simili nei controlli che nei diabetici. In un altro studio, è stato dimostrato l'aumento delle concentrazioni della betatrofina nel plasma in pazienti affetti da diabete di tipo 2<sup>89,90,91</sup>, rispetto ai controlli. In questo studio, sono stati reclutati 76 soggetti, di cui 20 magri, 19 patologicamente obesi, 19 non diabetici e infine 18 diabetici di tipo 2. I livelli di betatrofina sono stati negativamente associati con la sensibilità all'insulina epatica, mentre c'è stata una correlazione positiva con 2hPG e i livelli d'insulina postprandiali (PSI). I ricercatori hanno dunque ipotizzato che l'aumento della betatrofina nei diabetici di tipo 2, potrebbe essere attribuibile ad una risposta difensiva, che può rappresentare la capacità di adattarsi all'insulino-resistenza<sup>92</sup> epatica o all'aumento delle concentrazioni di glucosio nel sangue, aumentando di conseguenza, la proliferazione delle  $\beta$ -cellule e la secrezione d'insulina. Inoltre fu dimostrata anche una correlazione positiva tra l'età e i livelli di betatrofina, nonostante ci fosse un calo ben documentato nel tasso di replicazione delle  $\beta$ -cellule con l'età.

---

<sup>89</sup> Chen X, Lu P, He W, Zhang J, Liu L, Yang Y, Liu Z, Xie J, Shao S, Du T, Su X, Zhou X, Hu S, Yuan G, Zhang M, Zhang H, Liu L, Wang D, Yu X. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jan;100(1):E96-E100. doi: 10.1210/jc.2014-2300. PubMed PMID: 25303484.

<sup>90</sup> Espes D, Martinell M, Carlsson PO. Increased circulating betatrophin concentrations in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:323407. doi: 10.1155/2014/323407. Epub 2014 May 22. PubMed PMID: 24963292; PubMed Central PMCID: PMC4055101 .

<sup>91</sup> Fu Z, Berhane F, Fite A, Seyoum B, Abou-Samra AB, Zhang R. Elevated circulating lipasin/betatrophin in human type 2 diabetes and obesity. *Sci Rep*. 2014 May 23;4:5013. doi: 10.1038/srep05013. PubMed PMID: 24852694.

<sup>92</sup> Araújo TG, Oliveira AG, Saad MJ. Insulin-resistance-associated compensatory mechanisms of pancreatic Beta cells: a current opinion. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Oct 14;4:146. doi: 10.3389/fendo.2013.00146. Review. PubMed PMID: 24133484; PubMed Central PMCID: PMC3796265.

## **2. Scopo della tesi**

Poiché in questi ultimi anni sono stati ottenuti risultati sia entusiasmanti che deludenti sulla betatrofina, tanto che ancora oggi non sono ben chiari gli effetti e il ruolo di quest'ormone nell'uomo, lo scopo della mia tesi è stato quello di valutare il possibile coinvolgimento della betatrofina nella patologia diabetica. Per questo motivo sono stati arruolati soggetti sani, pazienti diabetici di tipo 1 e 2 e soggetti diabetici che avevano effettuato il trapianto combinato di rene-pancreas o pancreas isolato, afferenti all'U.O.C. di Malattie Metaboliche e Diabetologia. Sul plasma è stata quantificata la concentrazione di betatrofina circolante, misurati i livelli d'insulina, c-peptide e glucagone, per valutare le possibili differenze di concentrazione dell'ormone tra le varie tipologie di diabete (T2DM, T1DM, TX) e le correlazioni di quest'ultimo con gli altri parametri dei pazienti. Poiché la betatrofina sembra anche avere la funzione d'inibitore dell'attività della lipasi e di regolatore dei trigliceridi nel siero, attraverso estrazione dell'RNA e sua retro trascrizione, abbiamo valutato l'espressione genica della lipoproteina lipasi (LPL) nei pazienti diabetici. Infine, poiché la sequenza che codifica per la betatrofina si trova nel corrispondente introne del gene DOCK6, l'idea è stata quella di esplorare l'associazione di quest'ormone e dei parametri glicometabolici con due polimorfismi a singolo nucleotide, l'rs1541944 (SNP C/T) e l'rs892066 (C/G). Tutto ciò per comprendere se la betatrofina possa avere un meccanismo fisiologico che sia in grado di portare, se non proprio alla protezione o replicazione, quantomeno alla preservazione delle  $\beta$ -cellule pancreatiche nel tempo.



### **3. Materiali e Metodi**

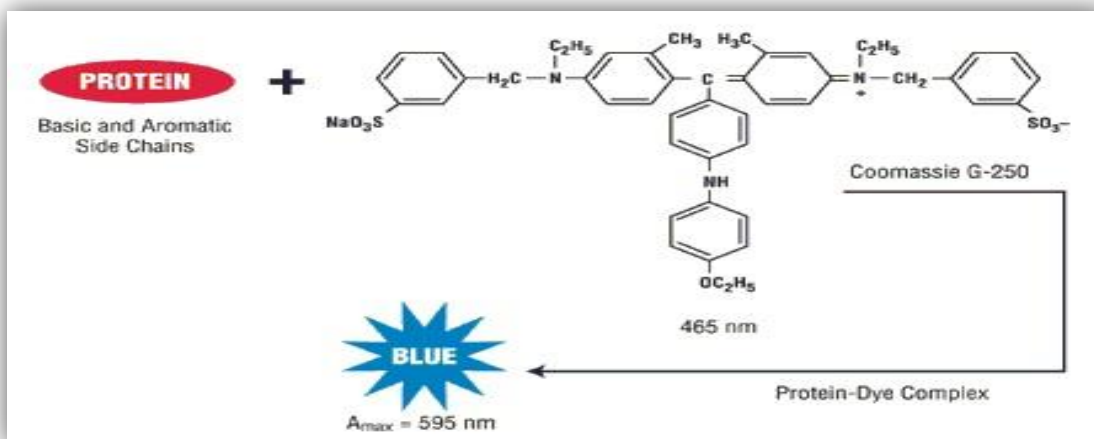
#### **3.1. Reclutamento dei pazienti e raccolta dei campioni biologici**

Per questo studio sono stati reclutati soggetti sani (ND), pazienti con diabete mellito di tipo 1 (T1DM), pazienti con diabete mellito di tipo 2 (T2DM) e pazienti trapiantati (TX), afferenti all'U.O.C. Malattie Metaboliche e Diabetologia di Pisa dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana. Date le diverse caratteristiche cliniche della sindrome diabetica è stato necessario utilizzare gruppi di controllo diversi, confrontabili per età e IMC al gruppo di studio. Per ogni paziente è stato raccolto un campione di sangue in una vacutainer trattata con EDTA. Per separare il plasma dalla componente cellulare, il campione è stato centrifugato a 3500 rpm (2520 xg) per 10 min a 4°C. la componente plasmatica è stata conservata a -80°C o usata immediatamente per la determinazione della presenza della betatrofina attraverso Western blot e della sua concentrazione attraverso metodica ELISA, della concentrazione del glucosio, dell'emoglobina glicata, del c-peptide, dell'insulinemia, dei trigliceridi, HDL, LDL e del colesterolo totale. La componente cellulare nucleata del sangue è stata utilizzata per l'estrazione del DNA genomico o per l'isolamento dei linfomonociti o stoccata anch'essa a -80°C.

#### **3.2. Dosaggio proteico con metodo Bradford**

Per dosare le proteine presenti nel lisato cellulare è stato utilizzato il metodo di Bradford, il quale si basa sulla misura dell'assorbanza di un reagente affine per le proteine, il Cromassie Brilliant Blue (reagente di Bradford, *Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA*). Questo colorante in soluzione acida, si lega alle proteine tramite legami elettrostatici che si formano fra i propri gruppi sulfonici e la

proteina, formando così un complesso colorato che vira al blu con una lunghezza d'assorbimento di 595 nm. La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteine, per cui l'intensità del blu e l'assorbimento saranno proporzionali alla concentrazione proteica del campione in esame.



**Figura 3.** Meccanismo di reazione del reagente Bradford in presenza di proteine.

Fonte: [www.qcbio.com](http://www.qcbio.com)

**Metodica.** Preparare una curva di taratura ottenuta, diluendo una soluzione standard di albumina a differenti concentrazioni (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml), e sono stati diluiti 1:50 i campioni da dosare. Abbiamo aggiunto 1 ml di Cromassie Brilliant Blue (reattivo di Bradford) a 20 µl di ciascuno standard, a 20 µl di H<sub>2</sub>O deionizzata (utilizzata come bianco), e ad un'aliquota di 20 µl di ciascun campione. Infine, i campioni sono stati incubati per 5 minuti a temperatura ambiente prima della lettura allo spettrofotometro. La concentrazione proteica di ciascuna soluzione è stata estrapolata dalla curva di taratura precedentemente preparata.

### 3.3. Western Blot

La presenza della betatrofina nel plasma è stata valutata mediante Western Blot. Tale metodica ha permesso di identificare, con anticorpi specifici, la presenza della molecola di nostro interesse, separata dalle altre per dimensione mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. Il campione è stato trattato con 2-mercaptoetanolo per ridurre i ponti disolfuro e con sodio dodecil solfato (SDS) per rompere le interazioni idrofobiche delle proteine e caricarle negativamente. L'SDS legandosi fa sì che tutte le proteine abbiano un rapporto carica/massa simile; possano migrare unicamente secondo la loro dimensione e non in funzione della loro carica. Terminata la corsa elettroforetica, si esegue il trasferimento, e successivamente con anticorpi specifici è stata rilevata la presenza della betatrofina nel nostro campione.

**Metodica.** Abbiamo immunoprecipitato, eseguito la corsa elettroforetica, trasferito, ed infine sviluppato.

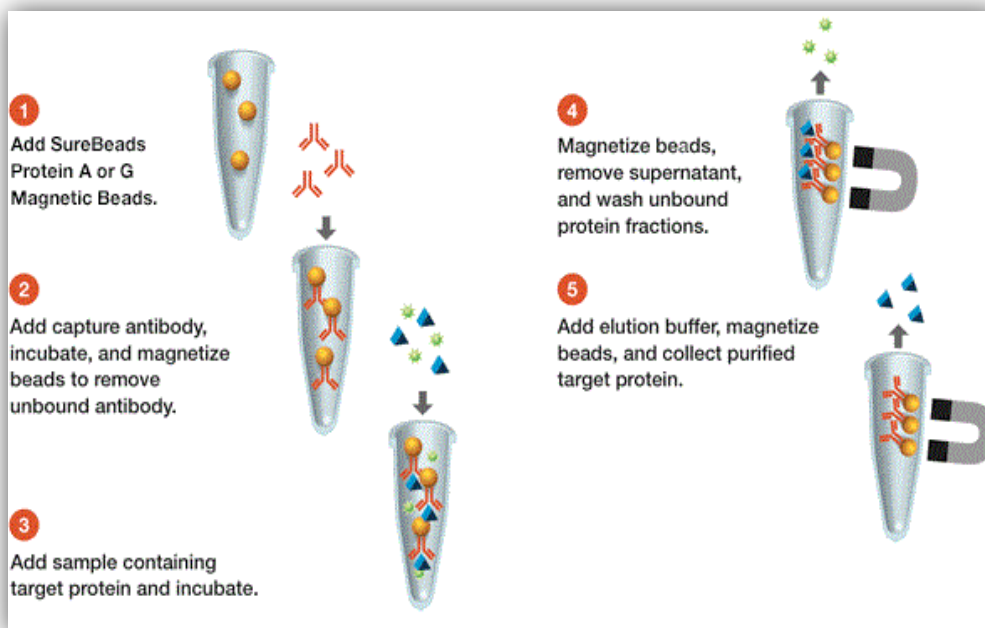
#### **Tampone di Immunoprecipitazione 2x (10 ml volume finale)**

- EDTA 2 mM 0,007 gr (100µl stock)
- EGTA 2 mM 0,008 gr (100 µl stock)
- NaCl 300 mM 200 µl
- Tris (pH 7.4) 20 mM 0,0024 gr (600 µl stock)
- Triton X100 2% 200 µl
- NP-40 1% 100 µl
- Vanadato 0,4 mM 40 µl (stock 0,1 M)
- PMSF 0,4 mM 20 µl (stock 0,2 M)

Portare a volume e portare a pH 7,8.

**Immunoprecipitazione con Magnetic Beads.** Risospendere la SureBeadse, trasferirne 50µl in eppendorf pulite da 1,5 ml, magnetizzare e scartare il surnatante. Lavare con 1 ml di PBS + 0,1% TWEEN20, risospendere, magnetizzare e scartare il surnatante, e ripetere per 3 volte. Aggiungere 3 µg (6µl) di Anticorpo primario (*C190rf80 Abnova*, *H00055908-B01P*) e 194 µl di Tampone di Immunoprecipitazione, precedentemente preparato, per portare a un

volume finale di 200  $\mu$ l. Rotare i campioni per 10 minuti a temperatura ambiente. Magnetizzare e scartare. Lavare nuovamente con 1 ml di PBS + 0,1% TWEEN20, riso spendere, magnetizzare, scartare e ripetere per 3 volte. Aggiungere 250  $\mu$ g (500  $\mu$ l di plasma) dei nostri campioni nelle corrispondenti eppendorf, e far ruotare per 1 ora a temperatura ambiente. Magnetizzare e scartare. Lavare con 1 ml di PBS + TWEEN20, riso spendere, magnetizzare, scartare e ripetere 3 volte. Spinnare per pochi secondi, magnetizzare ed aspirare il buffer residuo. Aggiungere 40  $\mu$ l di Laemmli 1x (*1x Laemmli Sample Buffer, Bio-rad Laboratories*), (il Laemmli va diluito con 2-mercaptoetanolo, 50  $\mu$ l di 2-mercaptoetanolo per 950  $\mu$ l di Laemmli), ed incubare per 10 minuti a 70°C. Magnetizzare ed aspirare l'eluato e caricare nei pozzetti del gel.



**Figura 4.** Principio d'immunoprecipitazione con Magnetic Beads. Fonte: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

**Corsa Elettroforetica e Trasferimento.** Per la corsa sono stati utilizzati gel di poliacrilammide (4-20%) preconfezionati (*Mini-PROTEAN® Precast Gels, Bio-rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK*). Nel primo pozzetto del gel sono stati caricati 5  $\mu$ g di standard, (*Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Bio-*



**Figura 5.** Apparecchiatura per elettroforesi. Fonte: [www.scienzeascuola.it](http://www.scienzeascuola.it)

Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK) un marcatore standard, costituito da una miscela di 10 proteine ricombinanti con peso molecolare definito (10-250 kDa), tipicamente colorate così da formare bande colorate visibili; nel secondo pozzetto 5 µg di controllo positivo per la betatrofina

(Betatrophin (139-198) (Human), Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) precedentemente diluita con Laemmli 4x, (10 µl di betatrofina + 3 µl di laemmli); nei pozzetti seguenti sono stati caricati 30µl dei nostri immunoprecipitati (2 ND, 2 T1DM, 2 T2DM). È stato aggiunto nella vaschetta il tampone di corsa, Running Buffer (450 µl H<sub>2</sub>O + 50 µl di buffer), e i campioni sono stati fatti correre a 80 V finché le bande nei pozzetti non si sono appiattite e poi il voltaggio è stato portato a 120 e lasciato correre per circa 50 minuti.

Terminata la corsa, abbiamo aperto i due vetrini, contenenti all'interno il gel, e trasferito quest'ultimo nel cassetto del Trans Blot Turbo (*Trans-Blot<sup>R</sup> Turbo<sup>TM</sup> Transfer System, Bio-Rad*), appoggiando prima le membrane con la nitrocellulosa, poi il gel su di essa, e chiudere con l'altra parte di membrana, in modo da formare un sandwich. Abbiamo Impostato il programma Biorad, High MW, che separa le proteine con un peso molecolare maggiore di 150 kDa, e trasferito per 15 minuti, 1,3 A, 25 V.



**Figura 6.** Trans-Blot Turbo Transfer Sistem, Bio-Rad utilizzato per il trasferimento. Fonte: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

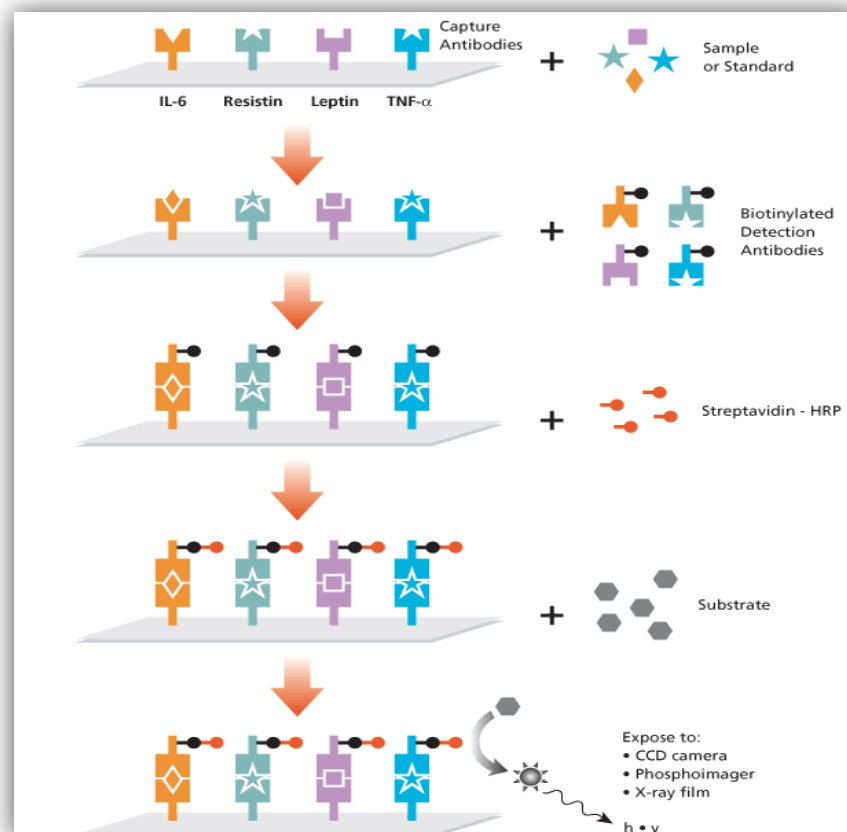
**Bloccaggio.** Al termine del periodo di trasferimento, la membrana è stata posta nella vaschetta, ricoperta con una soluzione di blocco (PBS + 0,1% TWEEN20 + BSA 5%), e lasciata per 1 ora a R.T. in agitazione continua. Questo comporta il bloccaggio di legami non specifici: in tal modo la BSA presente nella soluzione andrà a bloccare tutti i punti della membrana dove le proteine bersaglio non si sono legate. Questo passaggio permette, quando si aggiunge l'anticorpo, di non avere spazio sulla membrana per esso, poiché i siti sono già occupati dalla proteina specifica, portando a risultati più puliti ed eliminando i falsi positivi nel prodotto finale. Dopo il blocco, la membrana è stata lavata 3 volte con PBS + 0,1% TWEEN20 per 5 minuti in agitazione continua. È stato incubato con 5 µg (10 µl) di Anticorpo primario (*C190rf80 Abnova*, *H00055908-B01P*) in 12 µl di PBS + 0,1% TWEEN20 + 0,5% BSA, precedentemente preparata, e lasciare overnight a 4°C in rotazione continua.

**Sviluppo.** Il giorno dopo, la membrana è stata recuperata lavata 3 volte con PBS + 0,1% TWEEN20 per 5 minuti in agitazione continua ed aggiunto l'anticorpo secondario (anti-mouse diluizione 1:2000 in soluzione PBS + 0,1% TWEEN20 + 0,5% BSA), per 90 minuti a R.T. in agitazione. Terminato il tempo, rilavare 3 volte con la solita soluzione di lavaggio, per 5 minuti. La membrana è stata drenata su carta, ricoperta per 1 min con i reagenti ECL (*Clarity<sup>TM</sup> Western ECL Substrate, Bio-Rad Laboratories*) (1 ml di Luminol/enhancer solution + 1 ml di peroxide solution), asciugata su carta, ricoperta con pellicola e sviluppata. A questo punto, è stata eseguita dapprima una rilevazione con chemiluminescenza, che dipende dall'incubazione del western blot con un substrato che emette luce quando esposto al reporter dell'anticorpo secondario. In camera oscura procedere con lo sviluppo fotografico, inserendo la pellicola fotografica nella cassetta di esposizione (*BioMax Cassette, Carestream, NY, USA*), e posizionando sulla lastra, la membrana, così che la pellicola fotografica è stata impressionata dalla luce emessa dalla membrana. Abbiamo Chiuso la cassetta e incubato per 15 minuti. Terminati i minuti, la pellicola fotografica è stata immersa nello sviluppatore per circa 1 minuto, poi nel fissativo ed infine risciacquata in acqua e lasciata asciugare. Abbiamo riportato sulla pellicola le bande del marker e i kDa corrispondenti, come riferimento.

### 3.4. Dosaggio della betatrofina con metodica ELISA

La concentrazione della betatrofina è stata determinata mediante saggio enzimatico ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), basato sull'alta specificità di legame degli anticorpi per la struttura tridimensionale molecolare di un analita o di una famiglia di molecole. Il legame tra antigene ed anticorpo avviene, generalmente, nei pozzetti di una micropiastra e la reazione d'immunobinding è rivelata mediante misurazione dell'intensità del colore sviluppato da un enzima, solitamente una perossidasi, legata alternativamente all'anticorpo o all'antigene: il cosiddetto "coniugato" o tracciante. Sono utilizzati sia saggi immunologici competitivi che non-competitivi. I saggi non competitivi, a sandwich, possono essere applicati alla determinazione di composti ad elevato peso molecolare o di microrganismi, per stabilire se nel campione è presente l'antigene cercato: il disegno del saggio è di base sempre lo stesso, anticorpo di cattura nel pozzetto di reazione, anticorpo coniugato con un enzima aggiunto dopo la prima incubazione e lavaggio. Per gli ELISA competitivi i modelli possono essere diversi, con metodo diretto o indiretto, e sono messi a punto per misurare composti a basso peso molecolare, la cui struttura non permette il legame di due anticorpi contemporaneamente, e valuta la presenza dell'anticorpo contro un antigene all'interno del siero del nostro campione.

Il kit utilizzato per questo studio è stato un saggio di tipo non competitivo diretto, con metodica a sandwich, nel quale l'anticorpo usato per catturare la nostra molecola è assorbito sulla piastra, e gli anticorpi assorbiti sono in seguito esposti al campione che potrebbe contenere l'antigene, e un secondo anticorpo, coniugato con l'enzima, è aggiunto per rilevare che la molecola è stata catturata (*Betatrophin (139-198) (Human) Enzyme ImmunoAssay Kit Protocol, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.*)



**Figura 7.** Principio dell'ELISA con metodica a sandwich. Fonte: [www.phoenixpeptide.com](http://www.phoenixpeptide.com)

In questo kit, la piastra è pre-rivestita con un anticorpo secondario, i cui siti di legame non specifici sono bloccati. L'anticorpo secondario può legarsi al frammento Fc dell'anticorpo primario e il frammento Fab di quest'ultimo sarà vincolato sia dal peptide biotinilato, nel nostro caso la betatrofina biotinilata, che dal peptide mirato, la betatrofina, nel campione sconosciuto. La betatrofina biotinilata interagisce con perossidasi di rafano-streptavidina (SA-HRP) che catalizza la soluzione di substrato. L'intensità del colore giallo risultante è direttamente proporzionale alla quantità del complesso betatrofina biotinilata – SA-HRP, ma inversamente proporzionale alla quantità della betatrofina nel campione. Ciò è dovuto alla competizione tra la betatrofina biotinilata e quella presente nel campione per il legame con l'anticorpo primario. Si può stabilire una curva standard tracciando l'O.D. misurata in funzione delle varie concentrazioni di peptide standard conosciuto. La concentrazione della betatrofina sconosciuta



nel campione può essere determinata tramite estrapolazione basata su questa curva standard.

**Metodica.** Prima dell'utilizzo, il kit, conservato a 4°C, è stato equilibrato a temperatura ambiente (20-23°C). 50 ml di EIA assay buffer concentrate sono stati diluiti in 950 ml di acqua distillata, formando quello che è stato il nostro buffer usato per diluire o ricostituire tutti gli altri reagenti. La betatrofina standard (139-198) è stata ricostituita con 1 ml di buffer (soluzione standard di stock), 1000 ng/ml, l'anticorpo primario in 5 ml di buffer e il controllo positivo in 200 µl di buffer. A partire dalla soluzione standard di stock di betatrofina sono state preparate 5 diluizioni in serie: standard 1, 100 ng/ml; standard 2, 10 ng/ml; standard 3, 1 ng/ml; standard 4, 0,1 ng/ml; standard 5, 0,01 ng/ml e vortexato le 5 eppendorf. La curva di standard e i campioni sono stati caricati in doppio nella piastra. I pozzetti A1 e A2 non sono stati caricati, in quanto rappresentavano il bianco; nei pozzetti B1 e B2 sono stati aggiunti 50 µl di buffer, (i totali); da C1-C2 a G1-G2 sono stati caricati 50 µl della curva standard in doppio, a partire dallo standard 5; in H1 e H2 sono stati aggiunti 50 µl di controllo positivo. I pozzetti seguenti sono stati caricati con 50 µl dei campioni, sempre in doppietto. Nello stesso giorno, in ogni punto sperimentale, tranne che nei bianchi, sono stati aggiunti 25 µl di anticorpo primario. La piastra è stata ricoperta con una pellicola di acetato sigillante (APS) e incubata a 4°C per tutta la notte, in modo da favorire il legame della molecola con l'anticorpo primario.

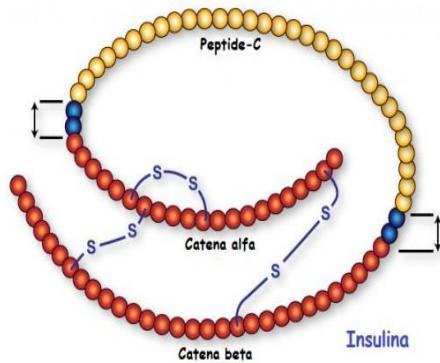


**Figura 8.** Piastra del kit ELISA. Fonte: [www.biosigma.it](http://www.biosigma.it)

Il giorno successivo, l'APS è stata rimossa dalla piastra, aggiunto 25 µl di betatrofina biotinilata (precedentemente ricostituita con 5 ml di buffer) in ogni pozzetto tranne che nel bianco (A1 e A2), e incubato per 2 ore a temperatura ambiente. Al termine del periodo d'incubazione, il contenuto della piastra è stato svuotato, effettuati i lavaggi per 4 volte con 350 µl di buffer in ogni pozzetto, e aggiunti 100 µl di SA-HRP (già centrifugata per 5 secondi a 3,000-5,000 rpm e in 12 ml di buffer sono stati aggiunti 12 µl di SA-HRP e vortexato il tutto). La piastra è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente, effettuati 4 lavaggi con 350 µl di buffer. Aggiunti 100 µl di substrato TMB in tutti i pozzetti, ed incubato per 1 ora a temperatura ambiente. Allo scadere dell'ora, senza rovesciare il contenuto della piastra e senza effettuare altri lavaggi, abbiamo bloccato la reazione aggiungendo 100 µl di 2N HCl in ogni pozzetto, variando il colore da blu a giallo. La lettura dell'assorbanza O.D. è stata eseguita a 450 nm in un lettore per piastre.

**Calcolo dei risultati.** Mettere sull'asse delle x (in scala logaritmica) la concentrazione degli standard, dallo standard 5 a 1, (da 0,01 a 100ng/ml). Mentre sull'asse delle y (scala lineare), inserire le assorbanze (O.D.) a 450 nm. Effettuare la media di tutti i doppietti (standard, controllo positivo, campioni) e sottrarre il valore medio del bianco ottenuto dalla lettura. Tracciare l'assorbanza per ogni concentrazione del peptide standard, direttamente sopra le coordinate dell'asse delle x, e disegnare la curva passante per i punti dati. Dovrebbe mostrare una relazione diretta tra la concentrazione dei peptidi e l'assorbanza; all'aumentare della concentrazione del peptide standard, il colore giallo diminuisce, riducendo così l'assorbanza. Per determinare la concentrazione della betatrofina nei nostri campioni, individuare prima la loro assorbanza sulle y e tracciare una linea orizzontale attraverso il grafico, e da tale assorbanza all'intersezione con la curva standard. A questo punto, l'intersezione sulla coordinata dell'asse delle x, corrisponderà alla concentrazione della betatrofina nel campione saggiato.

### 3.5. Dosaggio dell'insulina e del C-peptide con metodo I.R.M.A (ImmunoRadioMetricAssay)



**Figura 9.** Struttura della proinsulina. Fonte: [www.Histolab.it](http://www.Histolab.it)

Il C-peptide è un corto frammento proteico di 33 amminoacidi, prodotto nella fase di maturazione dell'insulina. Infatti, nel reticolo endoplasmatico, l'insulina è prodotta a partire dalla proinsulina, che viene processata da alcune endopeptidasi che staccano il C-peptide, generando la forma funzionale dell'insulina. Sia

l'insulina che il C-peptide sono immagazzinati, in concentrazioni equimolari, in granuli secretori che si accumulano nel citoplasma delle  $\beta$ -cellule pancreatiche. La stimolazione di quest'ultime determina l'esocitosi dei granuli e il rilascio nella circolazione portale di quantità equivalenti d'insulina e C-peptide. La determinazione della concentrazione di C-peptide insieme a quella dell'insulina e del glucosio, può essere di aiuto nelle diagnosi delle patologie diabetiche. Inoltre, nei pazienti diabetici che somministrano insulina esogena, il dosaggio del C-peptide è un valido indice della capacità secretoria residua del pancreas endocrino.

**Principio del test.** Il saggio prevede l'impiego di provette in polipropilene con il fondo rivestito di anticorpi monoclonali anti-insulina o, nel caso del dosaggio del C-peptide, anti-C-peptide. Dopo l'aggiunta del campione da dosare, il sistema viene completato da un anticorpo monoclonale tracciante marcato con I125. Seguono una serie di lavaggi e la rimanente radioattività legata alla provetta (radioattività residua) riflette la concentrazione di analita presente nel campione. Il sistema può essere utilizzato per la determinazione diretta dell'insulina o del C-peptide nel siero o nel plasma e prevede l'uso di anticorpi monoclonali murini, diretti contro due differenti epitopi del C-peptide e, quindi, non in competizione fra loro.

**Metodica.** I kit utilizzati, *Insulina e C-peptide IRMA Kit* (Beckman Coulter, CA, USA), sono dotati di provette sensibilizzate con l'anticorpo monoclonale specifico, d'immunoglobuline marcate con I125, di calibratori con concentrazioni comprese tra 0 e 6400 pmol/L, di sieri di controllo e soluzioni di lavaggio. I reattivi sono stati equilibrati a temperatura ambiente e contemporaneamente il contenuto dei flaconi dei calibratori e dei controlli è stato ricostituito aggiungendo il volume di acqua distillata riportato sull'etichetta. Per quanto riguarda la preparazione della soluzione di lavaggio è stato sufficiente versare il contenuto del flacone in 950 mL di acqua distillata. È importante diluire con il calibratore zero i campioni con concentrazioni di C-peptide superiori a quelle corrispondenti al calibratore con concentrazione più elevata.

All'interno dei tubi sensibilizzati con l'anticorpo anti-insulina o anti-C-peptide sono stati aggiunti 50 µL dei calibratori, 50 µL dei sieri di controllo o 50 µL dei campioni. Successivamente, per ogni provetta, incluse quelle non sensibilizzate e necessarie per la determinazione dell'attività totale, sono stati aggiunti 150 µL di anticorpo tracciante e ciascuna è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente, in agitazione (280 rpm). Al termine dell'incubazione, è stato aspirato con cura il contenuto di ciascuna provetta (eccetto i totali) ed è stato eliminato il tracciante in eccesso tramite due lavaggi consecutivi con 2 mL di tampone detergente. A questo punto la radioattività legata e la radioattività totale sono state lette al gamma-counter per un tempo di 60 secondi. Il gamma-counter traccia automaticamente il grafico della curva standard, ottenuta disponendo i cpmcal - cpmcal0 (colpi per minuto) sull'ordinata e la concentrazione dei calibratori (pmol/L) sull'ascissa, sia in un grafico lineare che in uno semi-logaritmico. La concentrazione dell'insulina, o analogamente del C-peptide, è poi ricavata per interpolazione dalla curva standard.

### 3.6. Dosaggio della glicemia

Il glucosio è un monosaccaride aldeidico ed è impiegato dall'organismo come substrato energetico nella glicolisi. L'organismo umano possiede un sistema di regolazione intrinseco che consente di mantenere relativamente costante la glicemia durante l'arco della giornata: nei soggetti sani a digiuno, il valore della glicemia deve essere compreso fra 60 e 110 mg/dl [152,153]. Il tasso glicemico è regolato da complessi meccanismi metabolici e neurormonali, che ne impediscono forti oscillazioni, ed è mediato principalmente dall'azione di due ormoni: l'insulina e il glucagone. Alterazioni di questo sistema di regolazione contribuiscono a provocare condizioni d'ipoglicemia (bassi livelli di glucosio nel sangue) o d'iperglicemia (alti livelli di glucosio nel sangue).

Per il prelievo e la preparazione dei campioni è consigliato utilizzare solo provette o contenitori di raccolta adatti e l'analisi può essere eseguita su siero o su plasma trattato con litio eparina, K<sub>2</sub>-EDTA o fluoruro. Per il nostro studio, il sangue venoso è stato prelevato da soggetti a digiuno da almeno 12 ore utilizzando un sistema di provette sottovuoto. Il campione è stato centrifugato a 3470 xg per 10 minuti a 4°C, posizionato sul piatto portaprovette del cobas 6000 c501 (ROCHE, Mannheim, Germany) e processato.

**Principio del test.** L'esochinasi (HK), utilizzando ATP, catalizza la reazione di fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato. La glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PDH), in presenza di NADP<sup>+</sup>, provoca l'ossidazione del glucosio-6-fosfato a gluconato-6-fosfato e la velocità di formazione del NADPH, durante la reazione, è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio e viene misurata fotometricamente [154,155].



I sistemi Roche/Hitachi **cobas c** effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione utilizzando il seguente fattore di conversione:

$$\text{mmol/L} \times 18,02 = \text{mg/dL}$$

$$\text{mmol/L} \times 0,1802 = \text{g/L}$$

$$\text{mg/dL} \times 0,0555 = \text{mmol/L}$$

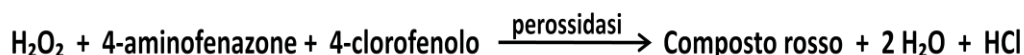
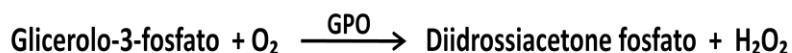
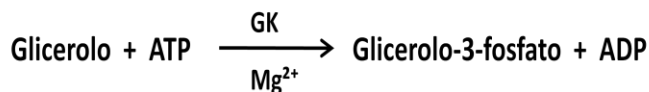
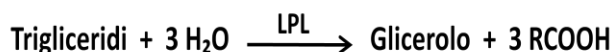
### **3.7. Dosaggio dei trigliceridi mediante metodo enzimatico colorimetrico**

I trigliceridi sono esteri dell'alcol trivalente glicerolo, recanti 3 acidi grassi a catena lunga. Essi vengono in parte sintetizzati nel fegato e in parte assorbiti con il cibo. La determinazione dei trigliceridi è impiegata per la diagnosi e per il trattamento dei pazienti con diabete mellito, con nefrosi, ostruzione del fegato, disfunzioni del metabolismo lipidico e con numerose altre malattie endocrine [160,161].

Per il prelievo e la preparazione dei campioni è consigliato impiegare solo provette o contenitori di raccolta adatti e l'analisi può essere eseguita su siero o plasma trattato con litio eparina o  $\text{K}_2\text{-EDTA}$ . Per il nostro studio, il sangue venoso è stato prelevato da soggetti a digiuno da almeno 12 ore utilizzando un sistema di provette sottovuoto. Il campione è stato centrifugato a 3470 xg per 10 minuti a 4°C, posizionato sul piatto portaprovette del cobas 6000 c501 e processato.

**Principio del test.** Questo metodo utilizza una lipoproteinlipasi (LPL) per la rapida e completa idrolisi dei trigliceridi in acidi grassi e glicerolo, che viene fosforilato a glicerolo-3-fosfato ad opera della glicerolochinasi (GK). Successivamente, la glicerolo-3-fosfato ossidasi (GPO) ossida il glicerolo-3-fosfato formando diidrossiacetone fosfato e perossido d'idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Per azione dell'enzima perossidasi, il perossido d'idrogeno reagisce con il 4-aminofenazone e il 4-clorofenolo e questa reazione favorisce la formazione di un composto di colore rosso (analisi end point, reazione a punto finale secondo

Trinder), la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione dei trigliceridi presenti nel campione e può essere misurata fotometricamente [158,162].



I sistemi Roche/Hitachi cobas c effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione utilizzando il seguente fattore di conversione:

$$\text{mmol/L} \times 88,5 = \text{mg/dL}$$

$$\text{mg/dl} \times 0,0113 = \text{mmol/L}$$

### 3.8. Estrazione di DNA genomico da sangue

Il kit utilizzato è il *QIAamp® Viral DNA Mini Kit* (QIAGEN), che permette di isolare il DNA dai più comuni tessuti umani, quali sangue, inclusi muscoli, fegato, cuore, cervello, midollo osseo, fluidi corporei, o anche dalle cellule, filtrando più volte il campione a seguito di lisi cellulare grazie all'ausilio di colonnine da centrifuga specifiche dotate di un filtro, ed essendoci nel kit, due diversi buffer di lavaggio, si ha l'eliminazione efficiente di eventuali agenti inquinanti, residui, in modo da migliorare la purezza del DNA eluito.

**Metodica.** Prima di iniziare con l'estrazione, conviene equilibrare a temperatura ambiente i buffer, miscelare quelli AL, ATL, proteinasi K, e campioni, ricostituire i buffer AW1, AW2 e l'RNA carrier ed accendere in bagnetto a 56°C. Ogni campione di sangue, è stato risospeso in un volume di 100 µl di buffer ATL, aggiunti 10 µl di proteinasi K, passati al vortex e aggiunti 100µl

di buffer AL e 1  $\mu$ l di RNA carrier; vortexati nuovamente per 15 secondi, ed incubati in un bagnetto a 56°C per 10 minuti. Dopo una breve centrifugata per eliminare eventuali goccioline dal tappo del tubo, ad ogni campione, sono stati aggiunti 50  $\mu$ l di etanolo puro (96-100%), vortexati brevemente ed incubati per 3 minuti a temperatura ambiente. Viene fatta nuovamente una centrifuga e la soluzione viene trasferita nelle colonnine QIAmp MinElute, evitando possibilmente di bagnare le pareti; si esegue una centrifugazione a 8000 rpm (6000 xg) per 1 minuto, per poi trasferire la colonna in un tubo pulito. A questo punto si eseguono i lavaggi; dopo aver scartato l'eluato, la colonnina viene trasferita in un tubo da 2 ml pulito, aggiunti 500  $\mu$ l di buffer AW1, centrifugata a 8000 rpm (6000 xg) per 1 minuto, scartato nuovamente l'eluato, cambiato tubo e aggiunti 500  $\mu$ l di buffer AW2, centrifugato a 8000 rpm (6000 xg) per 1 minuto. L'eluato viene scartato, e una volta cambiato tubo, viene effettuata un'ulteriore centrifuga alla massima velocità (20000 xg) per 3 minuti, così da eliminare quanto più possibile i residui della soluzione AW2. Come ultimo passaggio, la colonnina viene messa in un'eppendorf da 1,5 ml, aggiunti 40  $\mu$ l di buffer AE e incubata per 5 minuti a temperatura ambiente, e successivamente centrifugata a piena velocità per 1,5 minuti. A questo punto il filtro può essere eliminato e il filtrato ottenuto sarà il nostro DNA purificato, pronto per la lettura, l'uso o lo stoccaggio a -20°C.

### 3.9. Quantificazione del DNA estratto

Il DNA è costituito da basi puriniche e pirimidiniche in grado di assorbire le radiazioni UV con lunghezza d'onda di 260nm. Grazie a questa proprietà è possibile effettuare delle misurazioni di assorbanza con uno specifico strumento, lo spettrofotometro, per poi risalire, alla concentrazione dell'acido nucleico. L'assorbanza ( $A$ ) è un parametro correlato con la quantità di radiazione luminosa assorbita dal campione, ed è definita mediante la *Legge di Lambert & Beer*, secondo cui è direttamente proporzionale alla concentrazione ( $c$ ), nonché al coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon_o$ ), caratteristico per ogni sostanza, e al cammino ottico della cuvetta ( $d$ ) che misura 1 cm.



$$A = \varepsilon_0 \cdot c \cdot d$$

Da questa formula, misurando l'assorbanza, è possibile risalire alla concentrazione del campione, espressa in µg/ml:

$$c = \frac{A}{\varepsilon_0 \cdot d}$$

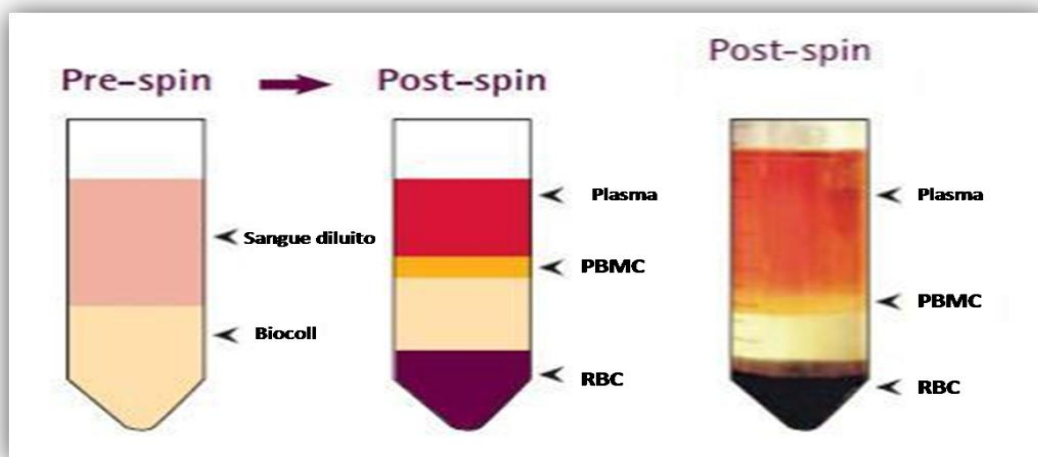
Se lo spettrofotometro utilizzato, è di recente innovazione, come nel nostro caso, tali operazioni sono automatiche, per cui risulterà sin da subito la misura della concentrazione del campione. Due ulteriori letture a 280 nm e 230 nm permettono di determinare la purezza dell'acido nucleico: misurando il rapporto A260/A280 si ottiene un indice della contaminazione da proteine; per il DNA tale rapporto deve essere compreso tra 1,65 e 2,50. Misurando, invece, il rapporto A260/A230 si ottiene un indice della contaminazione da carboidrati e fenoli contenuti negli eventuali solventi utilizzati per la purificazione del DNA; il valore ottimale di questo rapporto è di circa 2,20.

**Metodica.** Per la misurazione del DNA si utilizza una cuvetta al quarzo che permette il passaggio degli UV. Per prima cosa s'impone lo spettrofotometro sulla lunghezza d'onda di 260 nm per la lettura del DNA; successivamente si riempie la cuvetta con 1 ml di acqua deionizzata, che costituirà il bianco, utilizzato per l'azzeramento dello strumento. I campioni per la misurazione sono preparati diluendo 5 µl di DNA in 995 µl di acqua deionizzata. S'inserisce la cuvetta col campione nello spettrofotometro e si avvia la lettura. La misurazione mostrerà il valore della concentrazione del DNA espresso in µg/ml e i valori dei rapporti A260/A280 e A260/A230 per la stima della purezza del campione.

### 3.10. Isolamento dei linfomonociti da sangue periferico

I linfomonociti sono stati isolati dalla componente cellulare nucleata dopo centrifugazione di sangue periferico in EDTA. La procedura più comunemente

usata è la separazione mediante centrifugazione su gradiente di densità. È stata utilizzata una soluzione contenente un polimero idrofilico, con densità di 1077 g/ml (*Biocoll Separating Solution*, *Biochrom AG, Berlin, Germany* - *Lymphoprep™*, *STEMCELL Technologies*). Il sangue è stato diluito 1:3 con soluzione fisiologica (NaCl 0,9%), per evitare la formazione di aggregati cellulari, stratificato molto lentamente su gradiente Biocoll, ed il tutto è stato centrifugato per 35 min a 1200 rpm (400 xg) senza freno a 18-20°C. Questo passaggio permette la stratificazione delle cellule del sangue in base alla densità: gli eritrociti raggiungono il fondo della provetta, i polimorfonucleati si raccolgono in una sottile patina bianca al di sopra dei globuli rossi, mentre le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC: *periferal blood mononucleated cell*) formano un anello biancastro all'interfaccia tra il plasma e il polimero.



**Figura 10.** Meccanismo di formazione del gradiente di densità. Fonte: <http://dublinlisacoolsaet.wordpress.com/>

A questo punto i PBMC contenuti nell'anello bianco, sono stati prelevati con una pipetta pasteur, e messi in una falcon pulita, insieme ad un volume di soluzione fisiologica pari a circa 3 volte il volume dei linfomonociti; è stata effettuata una nuova centrifuga a 1800 rpm (600 xg) per 16 min a 18-20° con freno. Al termine è stato scartato il surnatante e sono state risospese le cellule ancora in soluzione fisiologica e sottoposte a una centrifuga di 8 min a 1200 rpm

(400 xg) a 4°C con freno. Scartato ancora il surnatante e risopsese, sono state trasferite in eppendorf pulite e centrifugate per 10 min a 10000 rpm a temperatura ambiente, al termine della quale, è stato aspirato il surnatante con una siringa e il pellet formatosi è stato congelato a -20°C per l'estrazione dell'RNA.

### 3.11. Estrazione dell'RNA totale

Il kit utilizzato per l'estrazione dell'RNA è stato il *QIAmp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN), con in dotazione colonnine con filtro, DNasi, carrier-RNA e buffers di lavaggio. Il filtro presente nelle colonnine ha permesso l'isolamento dell'RNA, intatto e con un elevato grado di purezza. Il carrier-RNA, aggiunto al buffer AVL, ha favorito il legame dell'RNA alla membrana di silice delle colonnine, mentre la salinità ed il pH hanno fatto in modo che i contaminanti e le proteine non si legassero. I tamponi di lavaggio AW1 e AW2 hanno permesso l'eliminazione dei residui, purificando l'RNA, ed infine, il buffer AVE, utilizzato per l'eluizione, essendo RNasi-free e contenendo sodio azide allo 0,04%, ha fatto sì che non vi fosse degradazione del materiale, né contaminazione microbica.

**Metodica.** Per l'estrazione sono stati utilizzati materiali e soluzioni privi di RNasi, così da evitare possibili contaminazioni del campione. Il primo passaggio prevede di aggiungere al pellet cellulare, 140 µl di soluzione salina (*Hank's Balanced Salt Solution*), e successivamente 560 µl di buffer AVL e 5,6 µl di carrier-RNA. Per assicurare un'efficiente lisi è necessario mescolare i reagenti in modo da ottenere una soluzione omogenea, per cui si vortexa per 15 secondi o si risospende con una pipetta per 30 volte, ed incubato per 10 minuti a temperatura ambiente; in questo periodo di tempo, gli agenti potenzialmente infettivi ed eventuali RNasi vengono inattivati, grazie al buffer AVL. Lo step successivo prevede una breve centrifugazione per rimuovere eventuali gocce dal tappo; si scarta il surnatante e si aggiungono 560 µl di etanolo puro (96-100%), e ciascun campione si passa al vortex al fine di assicurare un efficiente legame. A questo punto 630 µl della soluzione ottenuta vengono trasferiti nella colonnina, centrifugati a 8000 rpm (6000 xg) per 1 minuto, scartato il filtrato, cambiato tubo

ed aggiunti i restanti 630 µl, così da ripetere la centrifugazione. Dopo aver scartato il tubo di raccolta contenente l'eluato, ed averlo sostituito con uno nuovo, è stata preparata la soluzione composta da 10 µl di DNasi e 90 µl di Buffer per DNasi, e ne sono stati introdotti 95 µl nella colonnina, per campione; il tutto è stato incubato a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente, mediante lavaggi, sono stati eliminati eventuali agenti inquinanti residui; per prima, sono stati aggiunti alla colonnina 500 µl di buffer AW1 e centrifugati a 8000 rpm (6000 xg) per 1 minuto, dopo, scartato l'eluato, sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW2 e centrifugati a 13000 rpm (20000 xg) per 5 minuti. Nell'ultimo step il filtro viene posizionato su un'eppendorf da 1,5 ml, aggiunti 40 µl di buffer AVE, s'incuba per 1 minuto a temperatura ambiente, e si centrifuga per un altro minuto a 8000rpm. Una singola eluizione con il buffer AVE è sufficiente a purificare almeno il 90% dell'RNA virale, mentre una seconda eluizione può aumentare la resa di oltre il 10%. A questo punto il filtro può essere scartato e il filtrato ottenuto sarà la soluzione di RNA purificato, che sarà stoccato e conservato a -20°C.

### **3.12. Quantificazione dell'RNA totale estratto**

La lettura dell'RNA allo spettrofotometro, come per il DNA, è effettuata a 260 nm, dato che si tratta di una molecola con basi azotate. Per questo motivo è importante che, durante la purificazione, il passaggio di eliminazione del DNA dal campione, sia eseguito con cura, poiché la presenza di quest'ultimo in campioni di RNA va ad alterare l'assorbanza della soluzione, causando errori nella quantificazione. Come per il DNA, sono state effettuate letture a 280 nm e 230 nm per avere una stima della purezza del campione.

**Metodica.** S'imposta lo spettrofotometro a 260 nm col programma di lettura per l'RNA, quindi si azzerà con il bianco e si procede con i campioni; questi sono stati preparati diluendo 3 µl di RNA in 997 µl di acqua deionizzata. Come per il DNA, le letture forniranno la concentrazione espressa in µg/ml e i due rapporti per la stima della purezza del campione.

### 3.13. Retrotrascrizione dell'RNA totale estratto

La retrotrascrizione è un processo attraverso il quale una molecola di RNA viene convertita in un filamento di DNA complementare (cDNA). La reazione avviene per mezzo dell'enzima *trascrittasi inversa*, che sintetizza una catena di DNA complementare ad uno stampo di mRNA, utilizzando i quattro desossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), ed un primer, una breve molecola che si appaia all'estremità 3' avviando la reazione.

**Metodica.** Il kit utilizzato per la retrotrascrizione dell'RNA è stato l'*iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, CA, USA)*, contenente l'*iSCRIPT Reaction Mix 5x*, che contiene i quattro dNTP in concentrazione 25 mM, l'*iSCRIPT Reverse Transcriptase* che contiene invece l'enzima trascrittasi inversa che opererà la reazione, e la *Nuclease free water*. Per ogni campione e per un volume finale di 20 µl, si aggiungono 4 µl d'*iScript Reaction Mix 5x*, 1 µl di Reverse Transcriptase, 1 µg di RNA totale, il cui volume varia in base alla concentrazione dell'RNA stesso, e acqua RNasi free per portare a volume. La soluzione è incubata in un cicizzatore (*GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer, MA, USA*), che varia la temperatura per diversi intervalli di tempo, utilizzando il seguente ciclo termico:

- 5 minuti a 25° C
- 30 minuti a 42° C
- 5 minuti a 85° C
- 4° C stop

L'alta temperatura della terza tappa, oltre a determinare l'inattivazione dell'enzima ed il suo distacco dallo stampo di mRNA, serve per separare i filamenti di cDNA di nuova sintesi dalle catene di mRNA.

Il cDNA ottenuto può essere amplificato in Real Time-PCR ed utilizzato per studiare l'espressione genica di una proteina.

### 3.14. PCR Real-Time

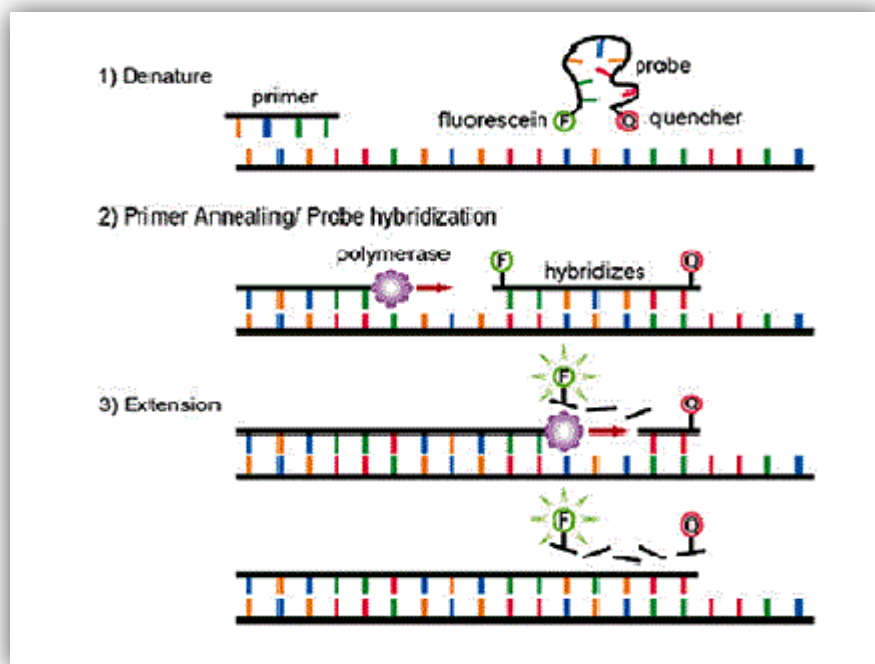
La reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction, PCR*), è una tecnica nata nel 1983, da un'intuizione di Kary Mullis (Premio Nobel nel 1993), e consente l'amplificazione di frammenti di acidi nucleici, al fine di ottenere molto rapidamente quantità di materiale genetico che possono essere utilizzata per studi successivi. Lo scopo della PCR è quello di ricostruire in vitro uno specifico passaggio della duplicazione cellulare, ovvero la sintesi di un segmento di DNA a doppio filamento, a partire da una molecola a singolo filamento. La sintesi ha origine a partire da due *primers* (un senso e un antisenso), che sono disposti in modo complementare alle estremità 3' dei filamenti di DNA da amplificare; questo processo è operato da una DNA-polimerasi, più precisamente dalla *Taq-polimerasi*, un enzima termoresistente isolato dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*, in grado di polimerizzare i nucleotidi presenti in soluzione sotto forma di dNTP, fino a temperature di 95°C. Il meccanismo di polimerizzazione consiste in tre tappe principali, caratterizzata ognuna da una diversa temperatura:

- **Denaturazione:** avviene intorno ai 95°C, temperatura che determina la separazione dei due filamenti della molecola di DNA;
- **Annealing:** la temperatura si abbassa fino a 52°C per permettere il legame dei primers alle regioni complementari dei filamenti denaturati;
- **Allungamento:** un innalzamento della temperatura a 72°C circa, permette di massimizzare l'azione della polimerasi che determina un allungamento dei primers legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA.

Questo ciclo viene ripetuto 40 volte così da ottenere quantità di amplificato sufficienti agli studi. La Real-Time PCR è dunque una PCR quantitativa ed in tempo reale, in quanto permette di quantificare il DNA amplificato durante lo svolgimento del processo stesso. Il metodo *Gold standard* utilizzato in Real-Time PCR corrisponde al metodo *Ct*, che si basa sulla definizione di un livello di fluorescenza soglia scelto dall'operatore, in modo da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale. Il valore *Ct* (threshold cycle), rappresenta il

ciclo frazionario della reazione di amplificazione, in cui il segnale della fluorescenza del campione interseca il valore soglia. Esistono diversi protocolli per l'attuazione di questa tecnica, e sono tutti basati sul rilevamento di segnali fluorescenti, attraverso l'uso di coloranti fluorescenti che s'intercalano nella molecola del DNA a doppio filamento (*Sybr Green*), o per mezzo di sonde specifiche rilevatrici di fluorescenza (*TaqMan*).

La Real-Time PCR *TaqMan* utilizza sonde rilevatrici di fluorescenza, capaci di accrescere la specificità di amplificazione. La valutazione quantitativa dell'acido nucleico è affidata alla rivelazione e alla conseguente quantificazione di un 'reporter' fluorescente, il cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità del prodotto di PCR presente. Per questo motivo, viene disegnata una sonda gene-specifica, generalmente lunga dalle 20 alle 30 paia di basi, capace di appaiarsi all'interno della sequenza riconosciuta dalla coppia di primers utilizzata. Tale sonda contiene due fluorocromi, FAM (6-carboxy-fluorescein) o VIC (4,7,2'-tricloro-7'-fenil-6-carbossifluoresceina) come reporter fluorescente, legato covalentemente all'estremità 5', e TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) come quencher legato covalentemente all'estremità 3', capace di assorbire nello spettro di emissione del reporter. Finchè la sonda è integra, la vicinanza tra quencher e reporter annulla l'emissione del segnale di fluorescenza. Replicando lo stampo, la Taq polimerasi incontra la sonda e comincia a degradarla grazie alla sua attività 5'-esonucleasica. L'allontanamento del reporter dal quencher pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa sì che il reporter inizi ad emettere fluorescenza. L'incremento di fluorescenza osservato è proporzionale alla quantità di prodotto di PCR presente.

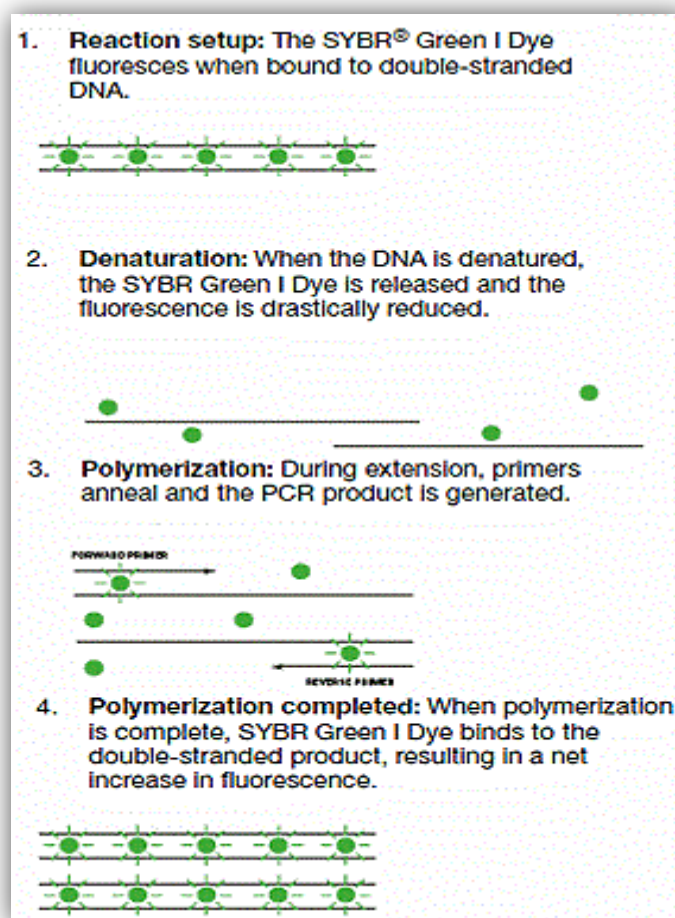


**Figura 11.** Meccanismo d'azione della reazione di PCR con sonda TaqMan.

Fonte: [www.gibthai.com](http://www.gibthai.com)

La *Sybr Green* è una molecola fluorescente che si lega in modo aspecifico al solco minore del DNA a doppio filamento (dsDNA). Il complesso DNA-SybrGreen assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda massima di 488 nm ed emette luce verde ad una lunghezza d'onda maggiore ( $\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$ ). All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primers e molecola fluorescente Sybr Green. Dopo l'annealing dei primers, solo poche molecole di Sybr Green si legano al dsDNA ed iniziano ad emettere fluorescenza; nel corso di ogni fase di allungamento la fluorescenza aumenterà progressivamente, man mano che aumenteranno il numero di copie dell'amplicone. L'incremento di fluorescenza rilevato è quindi proporzionale al numero di molecole Sybr Green intercalate nella doppia elica del DNA.





**Figura 12.** Meccanismo d'azione della reazione della PCR con sonda Sybr Green. Fonte: [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)

### 3.15. Valutazione dell'espressione genica della LPL mediante Real-Time PCR Sybr Green

Attraverso la RT-QPCR (*Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*) è possibile monitorare in tempo reale l'andamento della reazione di sintesi della DNA polimerasi, così da quantificare l'espressione dei geni in studio. Questo sistema sfrutta la molecola fluorescente Sybr Green I e richiede l'analisi di una curva di melting per la discriminazione dei prodotti di PCR

ottenuti (controllo qualità). Le espressioni analizzate in questo studio, con tale metodica, fanno riferimento al gene della lipoproteina lipasi (LPL), enzima sintetizzato principalmente nel tessuto adiposo, cardiaco e muscolare, con la funzione d'idrolisi dei trigliceridi. Per poi poter confrontare l'espressione del gene target in condizioni differenti, è stato necessario normalizzare i valori ottenuti con quelli di un gene avente espressione costante, detto housekeeping; sono stati utilizzati quelli codificanti per la Beta-Actina e la 18S.

Sonde utilizzate per l'analisi dell'espressione genica
<b>LPL:</b> PrimePCR SYBR Green Assay LPL, Human, qHsaCED0047106, BioRad
<b>β-Actina:</b> PrimePCR SYBR Green Assay ACTB, Human, qHsaCED0036269, BioRad
<b>18S:</b> PrimePCR SYBR Green Assay RPS18, Human, qHsaCEP0040177, BioRad

**Metodica.** Per ogni punto sperimentale è stata preparata una miscela di reazione con un volume finale di 20 µl, contenente:

- ✓ 10 µl di Sybr Green-iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, contenente desossiribonucleotidi trifosfato, Taq DNA polimerasi e molecola Sybr Green I (*Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK*);
- ✓ 1 µl di sonda (LPL, ACTB, 18S)
- ✓ 100 ng di cDNA (2 µl)
- ✓ 7 µl di H<sub>2</sub>O RNasi free

Successivamente la piastra multiwell da 48 per lettura in fluorescenza (*MultiplateR PCR Plates™, Bio-Rad, CA, USA*), è stata inserita nel termocicizzatore ed è stato impostato il protocollo specifico, che prevedeva, per i tre geni, un profilo termico con 40 cicli: inizialmente a 95°C. a 60°C ed infine a 72°C. al termine della reazione di PCR è stata inserita una curva di melting per mezzo della quale è stato possibile discriminare tra prodotti di amplificazione specifici e aspecifici.

La valutazione dei dati è stata eseguita con il metodo  $\Delta C_t$ , sono state fatte le medie dei cicli soglia ( $C_t$ ), del gene target e del gene housekeeping. È stata sottratta la media del gene housekeeping da quella ottenuta per il gene target:

$$\Delta C_t = \text{media } C_t \text{ Target} - \text{media } C_t \text{ housekeeping}$$

Il risultato ( $\Delta C_t$ ) è stato posto come esponente negativo di 2 ( $2^{-\Delta C_t}$ ) ottenendo il numero di volte che quel gene target è stato espresso in ogni condizione sperimentale.

### **3.16. Genotipizzazione di SNP con metodica Real-Time RT-PCR TaqMan**

Un polimorfismo a singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism* o *SNP*) è una variazione del materiale genetico a carico di un nucleotide, tale per cui l'allele polimorfico risulta presente nella popolazione in una proporzione superiore all'1%; al di sotto di tale soglia si è soliti parlare di variante rara. Gli SNPs possono presentarsi all'interno di una sequenza codificante di un gene, all'interno di una regione intronica o in una regione intergenica. Le conseguenze di questi polimorfismi possono essere silenti o non silenti, con un cambiamento del fenotipo, ed influenzare lo sviluppo delle patologie o la risposta ai patogeni, agli agenti chimici o ai farmaci. Dal momento che gli SNPs sono ereditati di generazione in generazione, vengono utilizzati in molti studi genetici.

Nel nostro studio la genotipizzazione di due SNPs è stata effettuata mediante Real-Time PCR con metodica TaqMan (*Applied Biosystem, Foster City, CA*); i due SNPs in questione sono *rs1541922* (C/T) e *rs892066* (C/G) situati entrambi sul gene *DOCK6* della betatrofina.

**Metodica.** Per il saggio è stato utilizzato il cicizzatore *MiniOpticon Real-Time PCR System* (*BioRad*) e l'analisi è stata effettuata su piastra *Multiplate™ 48-Well Unskirted PCR Plates* (*BioRad*). Per ogni pozzetto sono stati caricati 10

µl di *SsoFast™ Probes Supermix (BioRad)*, contenente i dNTP e la Taq polimerasi, 1 µl di sonda 20x per il polimorfismo studiato, almeno 20 ng di DNA del campione e un volume di H<sub>2</sub>O RNase free per portare ad un volume finale di 20 µl. Il saggio viene effettuato in doppio. Il protocollo utilizzato ha previsto una temperatura di denaturazione di 95°C per 3 minuti, quella di annealing di 95°C per 10 secondi, e quella di allungamento di 60°C per 1 minuto, per un totale di 39 cicli.

### **3.17. Studio della lunghezza dei telomeri mediante multiplex Real-Time QPCR**

Per determinare la lunghezza dei telomeri si ricorre ad una multiplex Real-Time PCR quantitativa (QPCR), che servendosi dell'amplificazione contemporanea di una curva standard di DNA, permette di produrre una misura relativa della lunghezza dei telomeri stessi. La curva standard è ottenuta mediante diluizione di una quantità nota di oligonucleotidi, contenenti solo ripetizioni TTAGGG, il cui numero, in ogni standard è calcolato usando dei parametri definiti. Tale sistema permette di determinare contemporaneamente il numero relativo di copie di due differenti sequenze, sfruttando un singolo fluoroforo intercalante del DNA, il Sybr Green. La molecola, intercalandosi nei dsDNA, consente di acquisire il segnale fluorescente emesso dagli ampliconi dei telomeri e dagli ampliconi della 36B4, sonda usata come riferimento. La lunghezza media relativa dei telomeri viene poi espressa come il rapporto tra il numero di copie delle ripetizioni telomeriche sintetizzate ed il numero di copie di 36B4 amplificate. Moltiplicando il rapporto per un valore costante pari a 4270, si ottiene la lunghezza del telomero espressa come numero di paia di basi (bp).

**Metodica.** La lunghezza dei telomeri è stata misurata attraverso una Real-Time PCR modificata rispetto al metodo di Cawthon. Per ogni punto sperimentale è stata preparata una miscela di reazione contenente la mix SYBR GREEN (composta da desossiribonucleotidi trifosfato, Taq DNA polimerasi e molecola

Sybr Green I) (*Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK*), 1 µl di ciascun oligo, senso ed anti-senso, specifico per i telomeri o per la 36B4 (2000 nM per i telomeri e 300 nM per il 36B4) e un volume opportuno di H<sub>2</sub>O RNase-free. Successivamente, in ogni pozzetto della piastra da 48 posti per PCR (*Multiplate® PCR Plates™, Bio-Rad, CA*), sono stati aggiunti, alla miscela preparata, un volume pari a 0.1 ng/µl di DNA genomico.

Primers	Sequenza 5' → 3'
<b>TELG2 Senso</b>	ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT
<b>TELC2 Anti-senso</b>	TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA
<b>36B4 Senso</b>	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
<b>36B4 Anti-senso</b>	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

**Tabella 1.** *Primers utilizzati per lo studio dei telomeri con metodica Multiplex Real-Time QPCR.*

La mix, con le sonde dei telomeri, è stata incubata con il campione per un ciclo di 15 minuti a 95°C, amplificata per 40 cicli di PCR con 5 secondi a 95°C, 10 secondi a 56°C and 60 secondi a 72°C. Per il 36B4, la mix è stata incubata per un ciclo di 15 minuti a 95°C, amplificata per 40 cicli di PCR per 10 secondi a 95°C, 30 secondi a 58°C e 30 secondi a 72°C. Per standardizzare i risultati sono stati utilizzati campioni di DNA genomico con lunghezza dei telomeri nota.

### 3.18. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta con il modello test T di student per dati indipendenti, e l'ANOVA con Correzione del Bonferroni. Il test T permette di verificare se due variabili hanno medie, varianze o distribuzioni uguali, e si può ricorrere ad esso anche per verificare se la differenza presente fra la media di una medesima misura, rilevata in due popolazioni diverse, sia casuale o meno. Per fare ciò, si applica, dunque, il test T ai dati raccolti e si confronta il valore ottenuto con i dati tabulati per verificare se la differenza tra le medie, sia dovuta o meno al caso. Il test ANOVA, invece, è utilizzato per confrontare due o più gruppi di dati, confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità ai gruppi stessi. Si ricorre a questo test quando si vuole verificare che la variabilità delle medie dei valori riscontrati in una popolazione sottoposta a diversi trattamenti, sia imputabile o meno al caso. Il livello di significatività impostato è quello del 5%, quindi per  $p < 0,05$ , la probabilità che la differenza riscontrata tra i due campioni in esame sia casuale, è inferiore al 5%, quindi il test è considerato statisticamente significativo e le due medie sono valutate come significativamente diverse. Infine, la Correzione del Bonferroni afferma, che se uno sperimentatore sta analizzando n ipotesi (dipendenti o indipendenti) su una serie di dati, il livello di significatività statistica che dovrebbe essere utilizzato per ogni ipotesi è  $1/n$  volte quello che sarebbe loro attribuito se anche solo un'ipotesi fosse empiricamente testata. Tutti i dati sono espressi come valore medio  $\pm$  errore standard della media (ES).

## 4. Risultati

### 4.1. Principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio

Nella **Tabella 2** sono riportate le principali caratteristiche cliniche dei soggetti reclutati, suddivisi per gruppi di studio. In particolare sono indicate l'età, il peso, l'altezza e l'indice di massa corporea (IMC). Il prelievo di sangue è stato autorizzato dai pazienti dopo firma per presa visione del consenso informato.

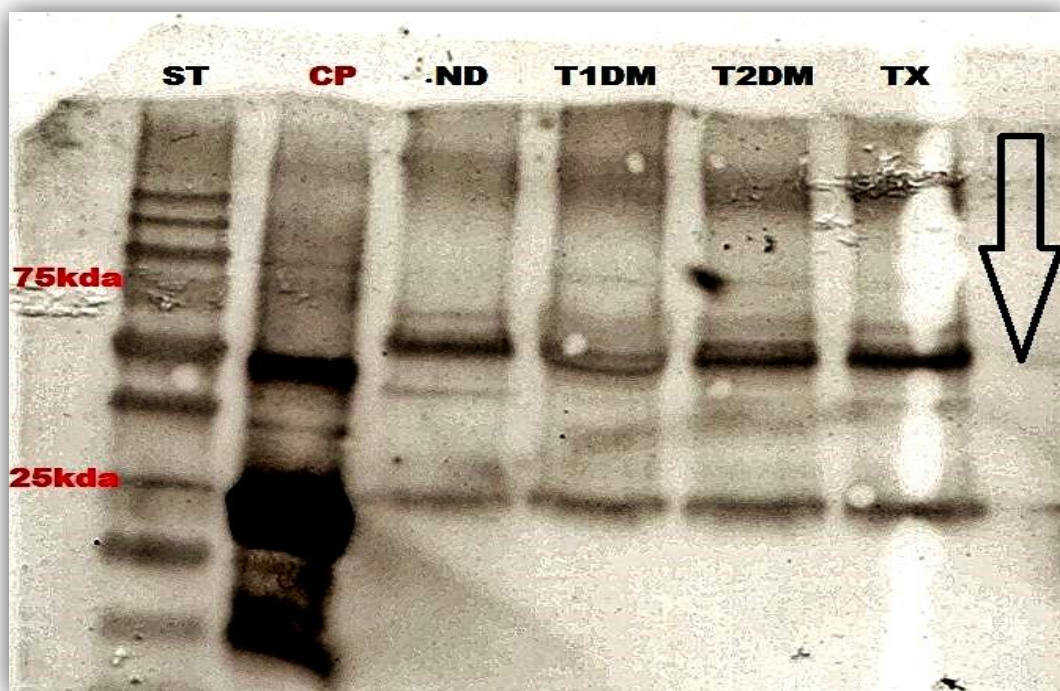
	N° soggetti	ETA' (anni)	GENERE	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
<b>ND</b>	13	36,08±13,31	7F/6M	27,22±9,16
<b>T1DM</b>	17	41,06±13,70	9F/8M	27,05±6,36
<b>T2DM</b>	49	64,55±9,80	25M/24F	29,09±5,97
<b>TX</b>	21	49,62±13,96	11F/10M	23,93±3,35

**Tabella 2.** *Principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio per la valutazione dei telomeri nei soggetti di controllo (ND), pazienti con diabete mellito Tipo 1 (T1DM), pazienti con diabete mellito tipo 2 (T2DM) e pazienti diabetici sottoposti a trapianto di pancreas (TX).*

### 4.2. Valutazione dell'espressione proteica plasmatica di betatrofina in soggetti ND, T1DM, T2DM e TX

La **Figura 13** rappresenta un esempio di corsa elettroforetica su gel di agarosio, trasferimento su membrana di nitrocellulosa e sviluppo con ECL dopo immunoprecipitazione delle proteine plasmatiche di soggetti ND, T1DM, T2DM e TX. La betatrofina era presente in tutti i gruppi studiati, con un peso molecolare di

circa 23 KDa, come confermato anche dall'altezza della banda relativa al controllo positivo.

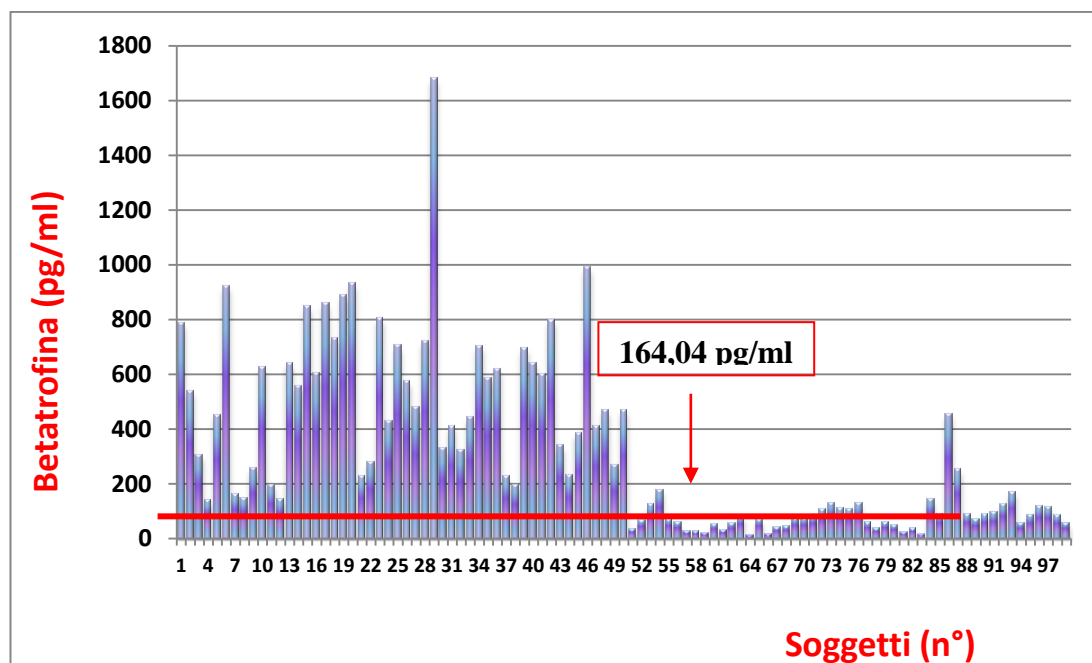


***Figura 13.** Esempio d'immagine di corsa elettroforetica su gel per la separazione della betatrofina plasmatica di ND, T1DM, T2DM e TX. La proteina è presente in tutti i campioni valutati (n=20). Nella corsa è stato inserito anche il controllo positivo (CP) della betatrofina.*

#### **4.3. Valutazione della concentrazione plasmatica di betatrofina nei soggetti arruolati per lo studio.**

Il passo successivo è stato quello di misurare, tramite metodica ELISA, la concentrazione plasmatica della betatrofina: come si può evincere dalla **Figura 14**, il valore dell'ormone circolante è risultato analizzabile in tutti i soggetti arruolati per il nostro studio, con un valore di mediana di 164,04 pg/ml.



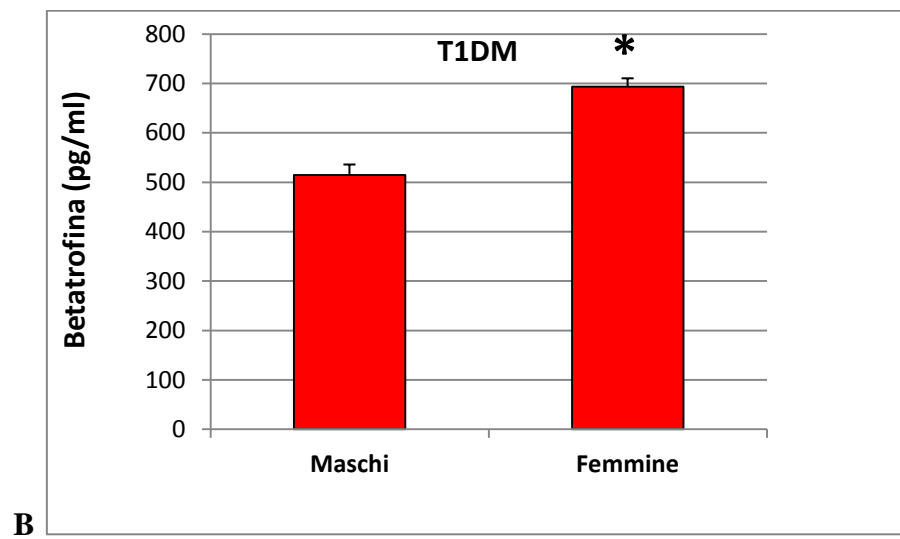
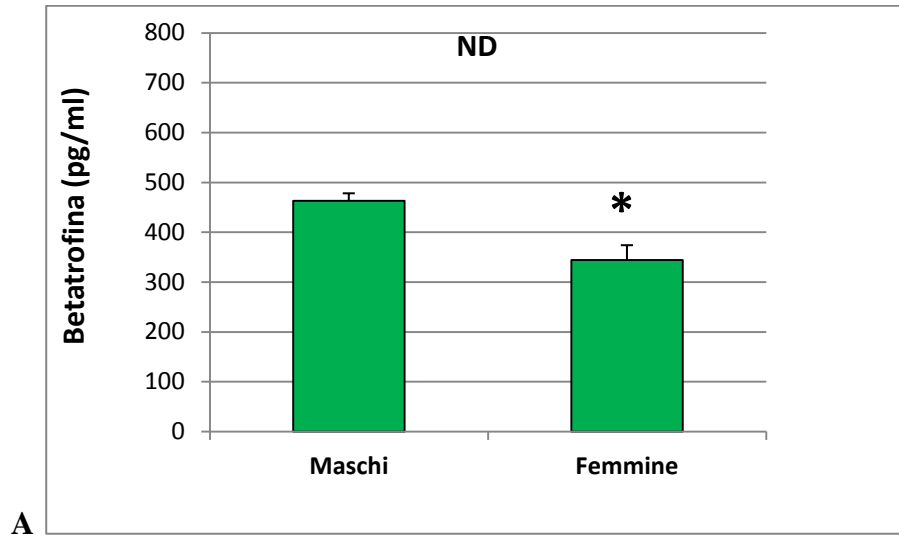


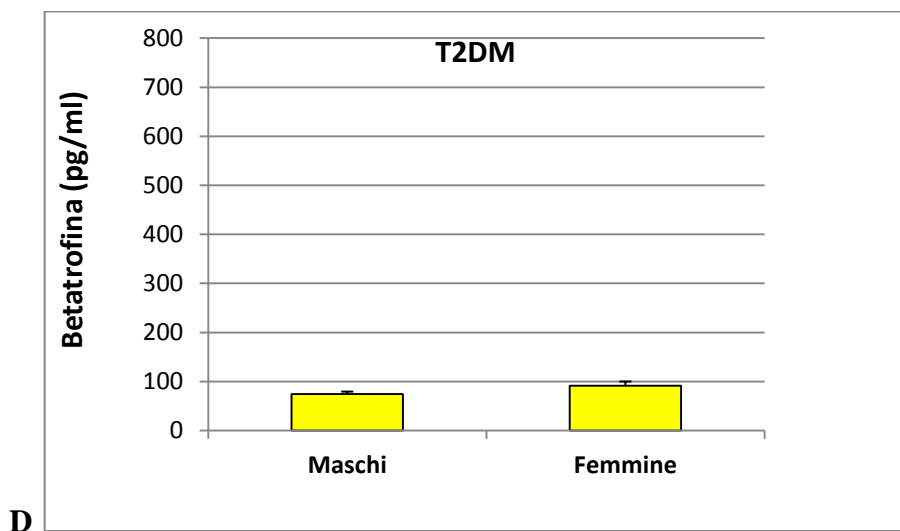
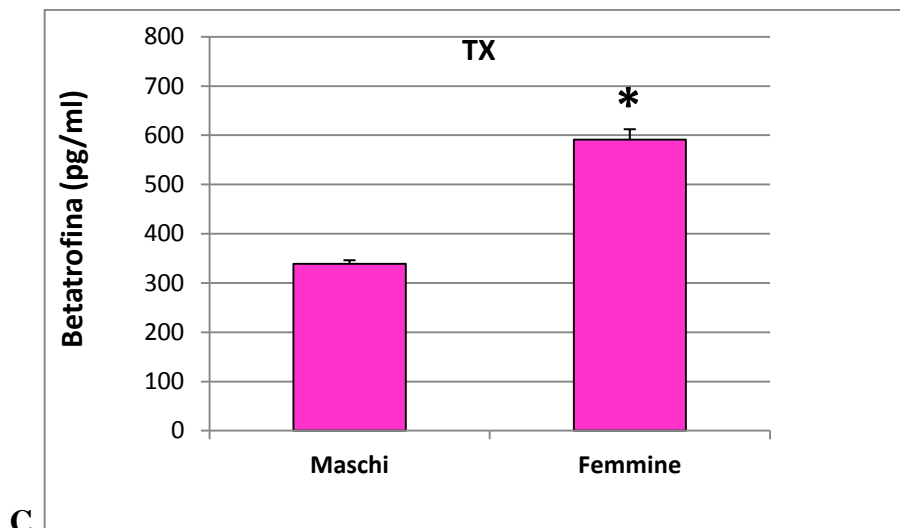
**Figura 14.** Concentrazione plasmatica di betatrofina: in tutti i soggetti studiati è stato possibile misurare il valore dell'ormone.

#### **4.4. Associazione fra il valore plasmatico di betatrofina e il genere maschile e femminile in soggetti ND, T1DM, T2DM e TX.**

Sulla popolazione studiata, suddivisa in base alla patologia, ND, T1DM, T2DM e trapiantati di pancreas (TX) è stato valutato se il genere potesse influenzare la concentrazione plasmatica della betatrofina. Come riportato nella **Figura 15 A-D**, nei controlli (ND) si ha un significativo aumento del valore dell'ormone nel genere maschile rispetto a quello femminile ( $*=p<0.05$  vs maschi. Test-t di Student). Contrariamente a quanto osservato nei controlli, la concentrazione della betatrofina nei soggetti T1DM e TX era significativamente maggiore nelle femmine rispetto ai maschi ( $*=p<0.05$  vs maschi. Test-t di

Student). Dato interessante, nei pazienti T2DM non si sono osservate differenze significative di concentrazione della molecola tra i due generi.





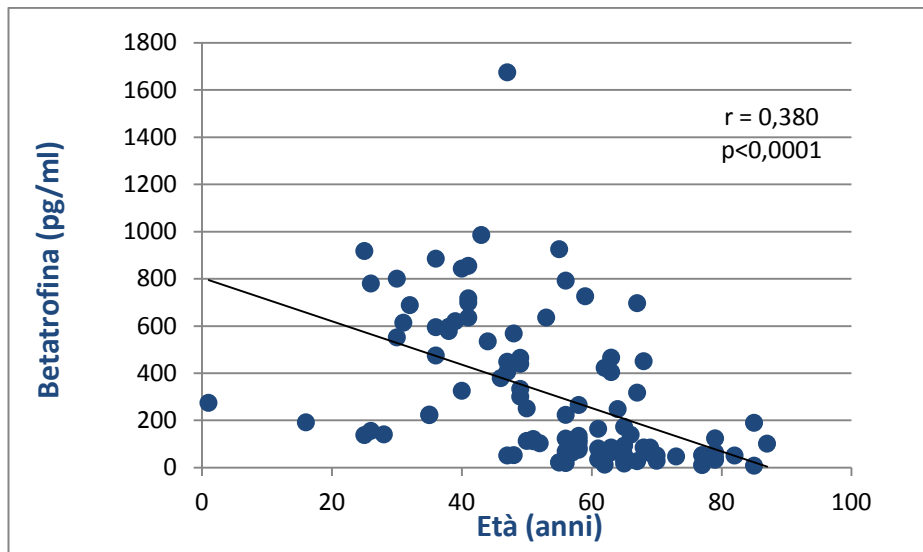
**Figura 15.A-D.** In figura sono riportate le concentrazioni della betatrofina in base al genere maschile e femminile, nelle varie tipologie della popolazione analizzata, ND (A), T1DM (B), T2DM (C) e TX (D). (\*= $p < 0.05$  vs Maschi. test-*t* di Student).

#### **4.5. Correlazione fra il valore plasmatico di betatrofina, caratteristiche antropometriche, parametri glicometabolici e di funzionalità pancreatica in tutti i soggetti arruolati per lo studio.**

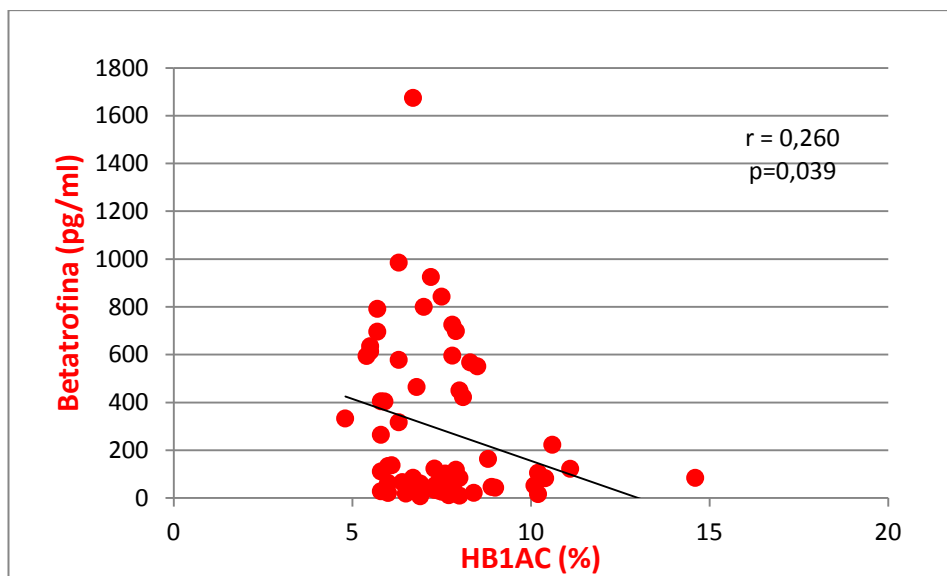
La concentrazione plasmatica della betatrofina è stata correlata con tutti i dati antropometrici e parametri glicometabolici e di funzionalità d'organo raccolti dei soggetti inclusi nello studio. In particolare, come riportato nelle **Figure 16.A-E**, i dati ottenuti dal dosaggio plasmatico hanno evidenziato una significativa correlazione negativa fra la betatrofina e l'età (**A**;  $r=0.380$ ,  $p<0.0001$ ), l'HbA1c (**B**;  $r=0.260$ ,  $p=0.0039$ ), i trigliceridi (**D**;  $r=0.252$ ,  $p=0.048$ ) e la glicemia (**E**;  $r=0.319$ ,  $p=0.0305$ ), mentre una significativa correlazione positiva con le HDL (**C**;  $r=0.382$ ,  $p=0.0006$ ). Escludendo dall'analisi i pazienti affetti da diabete mellito tipo 1, la proteina correlava direttamente con la concentrazione di c-peptide (**F**;  $r=0.396$ ,  $p=0.0006$ ).

L'analisi multivariata dell'insieme delle variabili indipendenti risultate significativamente correlate con la betatrofina nell'intera popolazione ha evidenziato un effetto marcato e significativo dell'età ( $p<0.0001$ ) e delle HDL ( $p=0.0023$ ) (**Tabella 3.A**). Escludendo i T1DM, il c-peptide rimane significativamente correlato con la concentrazione plasmatica della proteina ( $p=0.0009$ ), così come gli altri parametri, quali l'età ( $p=0.0079$ ), l'HbA1c ( $p=0.0476$ ), e l'HDL ( $p=0.0046$ ) (**Tabella 3.B**).

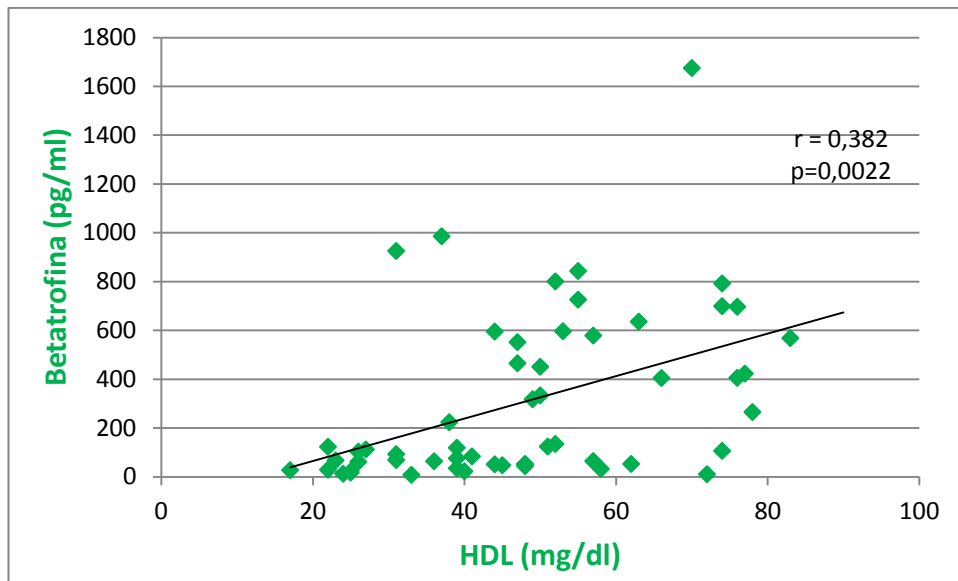
Non sono risultate significative le correlazioni fra la concentrazione plasmatica dell'ormone e tutti gli altri dati antropometrici, parametri glicometabolici e di funzionalità d'organo dei soggetti studiati.



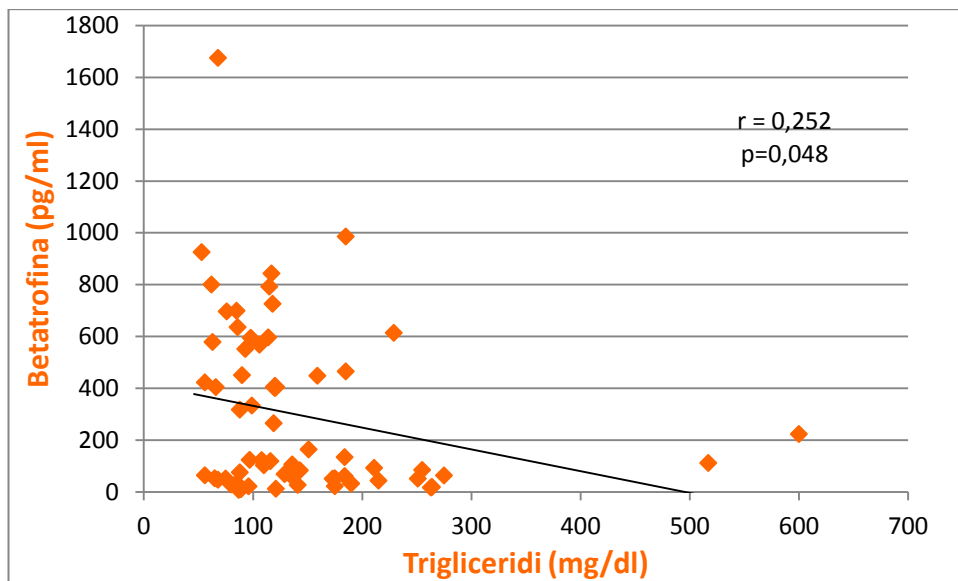
**A**



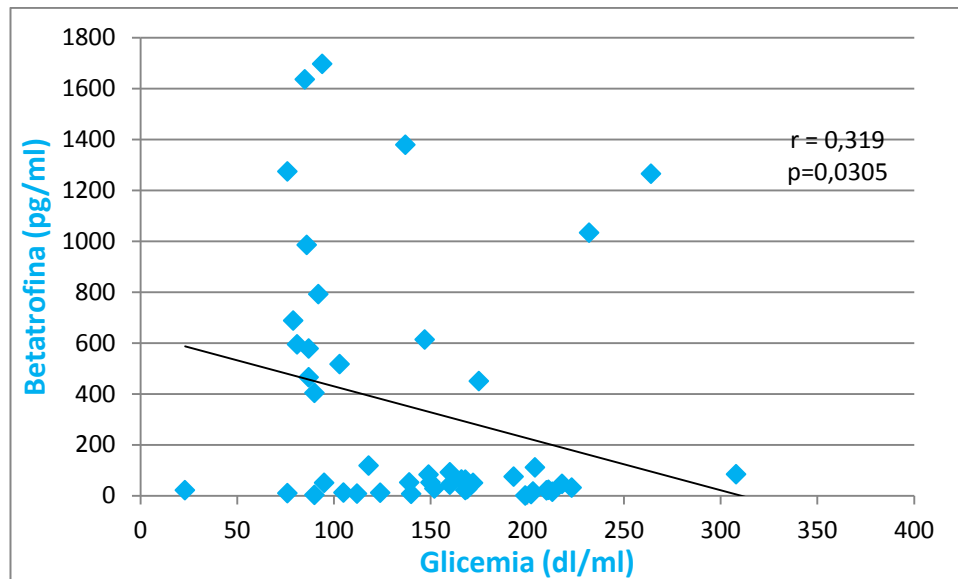
**B**



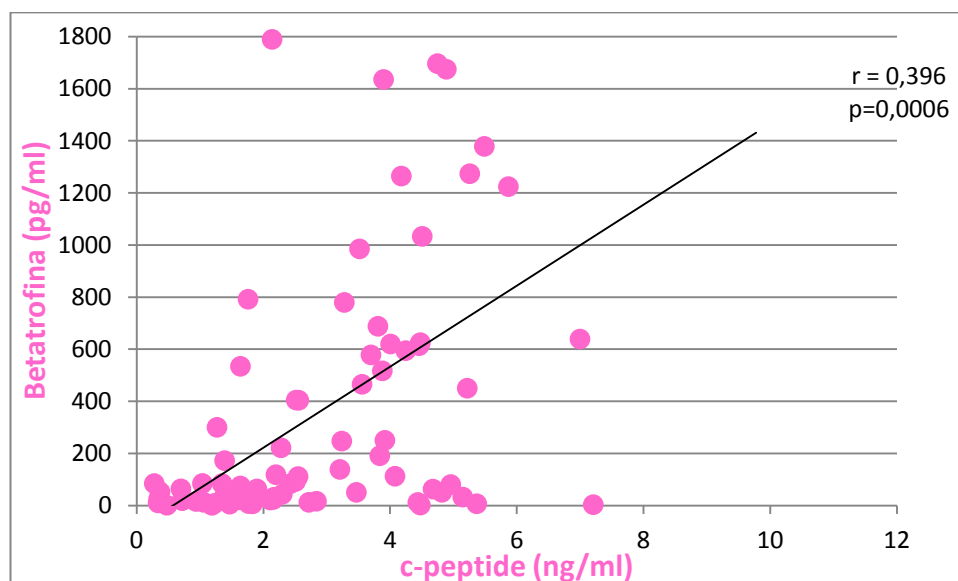
**C**



**D**



**E**



**F**

**Figura 16.A-F.** In Figura A-E sono riportate le correlazioni fra la concentrazione plasmatica della betatrofina ed età (anni), HB1Ac, HDL, trigliceridi, glicemia nella popolazione studiata, e in figura F la correlazione con il c-peptide nella popolazione esclusi i T1DM.

<b>A</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>ES</b>	<b>Valore t</b>	<b>P</b>
<b>Età (anni)</b>	<b>-13.522</b>	<b>2.944</b>	<b>-4.594</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>HB1Ac (%)</b>	<b>-32.313</b>	<b>26.638</b>	<b>-1.213</b>	<b>0.2308</b>
<b>Glicemia (dl/ml)</b>	<b>-0.704</b>	<b>0.590</b>	<b>-1.193</b>	<b>0.2396</b>
<b>HDL (mg/dl)</b>	<b>5.981</b>	<b>2.179</b>	<b>2.745</b>	<b>0.0084</b>
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	<b>-0.453</b>	<b>0.388</b>	<b>-1.168</b>	<b>0.2484</b>

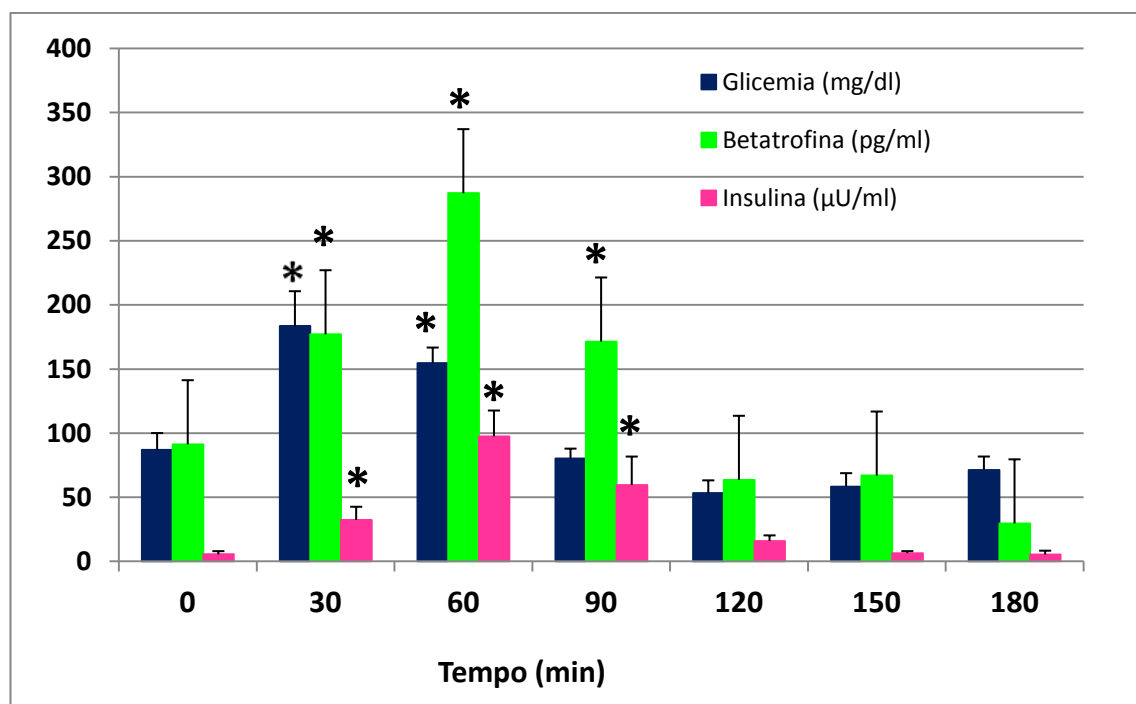
<b>B</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>ES</b>	<b>Valore t</b>	<b>p</b>
<b>Età (anni)</b>	<b>-7.634</b>	<b>2.710</b>	<b>-2.817</b>	<b>0.0079</b>
<b>HB1Ac (%)</b>	<b>-43.799</b>	<b>20.711</b>	<b>-2.115</b>	<b>0.0416</b>
<b>Glicemia (dl/ml)</b>	<b>0.194</b>	<b>0.580</b>	<b>0.335</b>	<b>0.7398</b>
<b>HDL (mg/dl)</b>	<b>5.225</b>	<b>1.727</b>	<b>3.025</b>	<b>0.0046</b>
<b>C-peptide (ng/ml)</b>	<b>43.137</b>	<b>20.364</b>	<b>2.118</b>	<b>0.0413</b>

***Tabella 3.A-B** Analisi multivariata dell'insieme delle variabili dipendenti risultate significativamente correlate con la betatrofina nell'intera popolazione studiata (A) e in quella in cui sono stati esclusi i T1DM (B).*



#### 4.6. Correlazione fra il valore plasmatico di betatrofina e la glicemia dopo curva da carico.

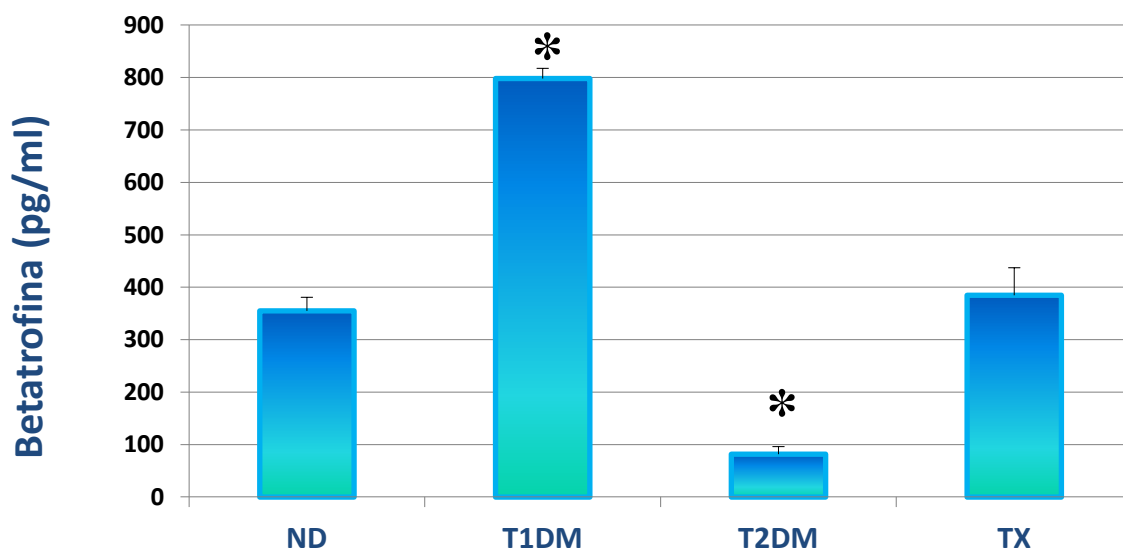
Contrariamente da quanto osservato nella popolazione studiata, in soggetti non affetti in modo franco da diabete la secrezione di betatrofina è associata al carico di glucosio e parallelo a quello dell'insulina. Come mostrato in Figura XX, la concentrazione dell'ormone aumenta fino a 60 minuti dopo il carico di glucosio, parallelamente all'insulina e rispondendo ad un aumento della glicemia plasmatica. Il valore della betatrofina tende a normalizzarsi dopo 120 minuti dal carico orale (**Figura 17**) (\*= $p < 0.05$  vs rispettivo tempo 0).



**Figura 17.** Curva da carico di glucosio in cui è stata valutato il rilascio di betatrofina e insulina in risposta ad un aumento della glicemia in soggetti non affetti da diabete. (\*= $p < 0.05$  o meno vs tempo 0. Test-t di Student).

#### 4.7. Valutazione della concentrazione plasmatica di betatrofina nei soggetti ND, T1DM, T2DM e TX

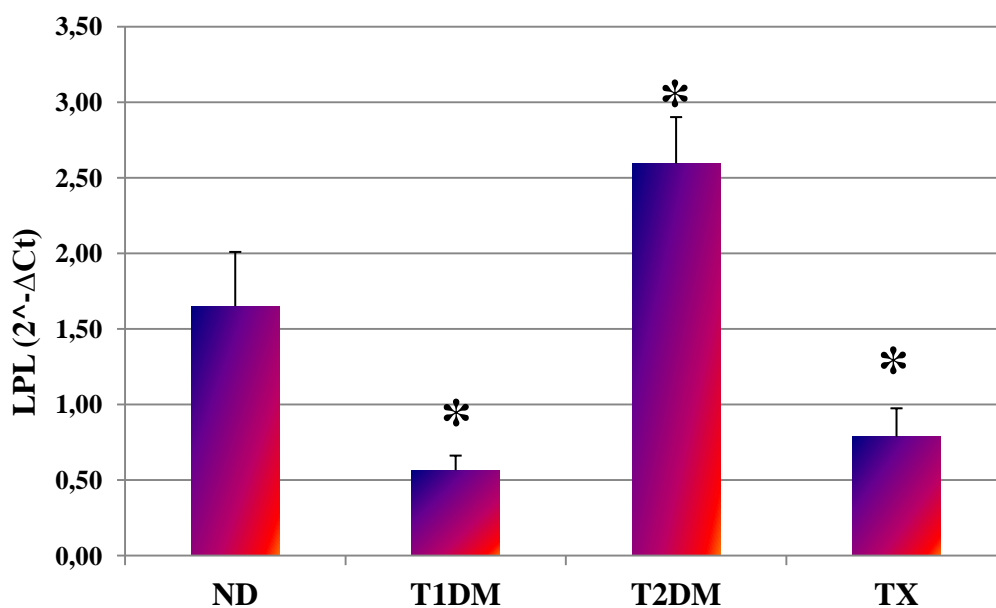
La popolazione totale è stata suddivisa, in base alla patologia, in ND, T1DM, T2DM e trapiantati di pancreas (TX). Su questi gruppi è stata valutata la concentrazione plasmatica di betatrofina. Come riportato in Figura X, nei T1DM il valore della proteina era significativamente maggiore rispetto ai ND, mentre si riduceva significativamente nei T2DM. Inoltre, nei soggetti TX la betatrofina ritornava a valori simili ai controlli (\*= $p < 0.05$  vs ND) (*Figura 18*).



*Figura 18.* Concentrazione plasmatica di betatrofina ND, T1DM, T2DM e TX, riportata come valore assoluto (\*= $p < 0.05$  vs ND. Test di Bonferroni).

#### 4.8. Valutazione dell'espressione genica per LPL nei soggetti ND, T1DM, T2DM e TX.

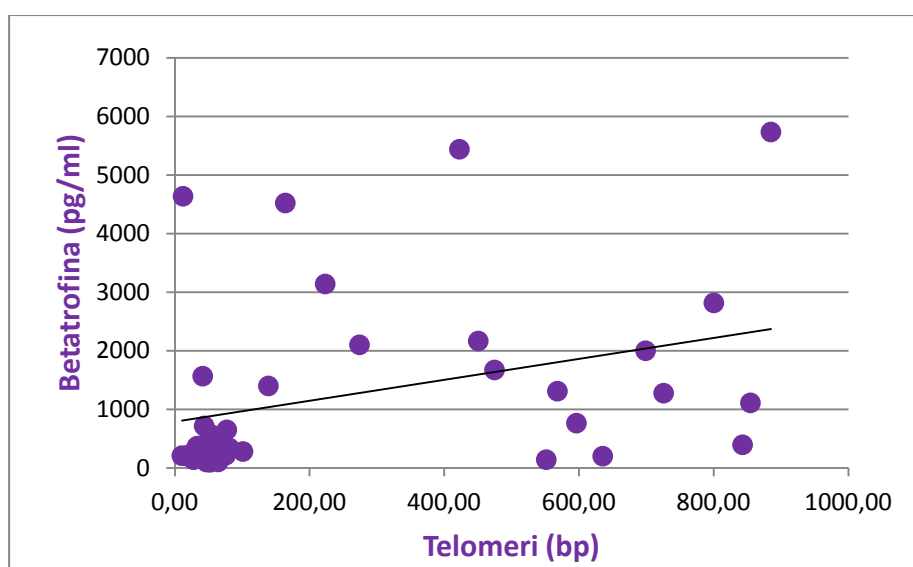
La lipoproteina lipasi (LPL) è un enzima presente sulla parete extracitosolica la cui funzione è di idrolizzare i trigliceridi. Poiché alcuni autori hanno suggerito che la betatrofina sembra inibire l'attività enzimatica della LPL (VOCI BIBLIOGRAFICHE) con un aumento della concentrazione plasmatica dei trigliceridi. Quello che abbiamo osservato è che, nella nostra popolazione, l'espressione genica per LPL è significativamente ridotta nei T1DM e significativamente aumentata nei T2DM, rispetto ai ND. Contrariamente a quanto atteso, nei TX la LPL è risultata significativamente ridotta rispetto ai ND (\*= $p < 0.05$  o meno vs ND) (**Figura 19**).



**Figura 19.** Espressione genica di LPL in ND, T1DM, T2DM e TX (\*= $p < 0.05$  o meno vs ND. Test-t di Student).

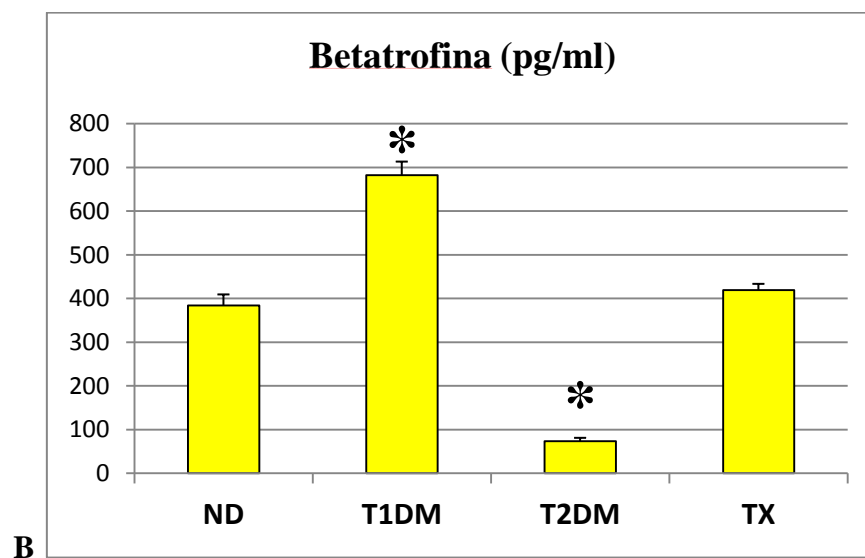
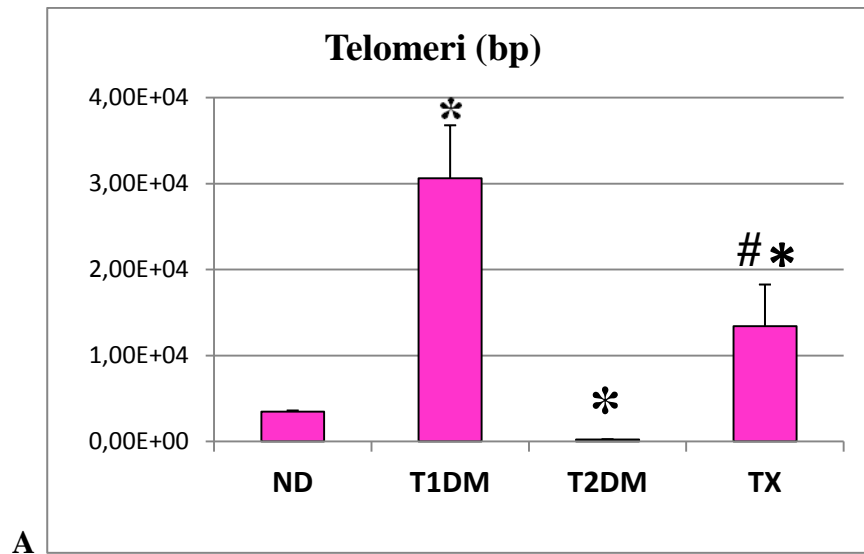
#### 4.9. Valutazione della lunghezza telomerica nei soggetti ND, T1DM, T2DM e TX.

Utilizzando una regressione lineare, nell'intera popolazione arruolata per lo studio, abbiamo osservato una correlazione positiva fra la concentrazione di betatrofina plasmatica e la lunghezza del telomero (**Figura 20**).



**Figura 20.** Correlazione positiva tra la concentrazione della betatrofina e la lunghezza del telomero sull'intera popolazione di studio. ( $p=0.0078$ )

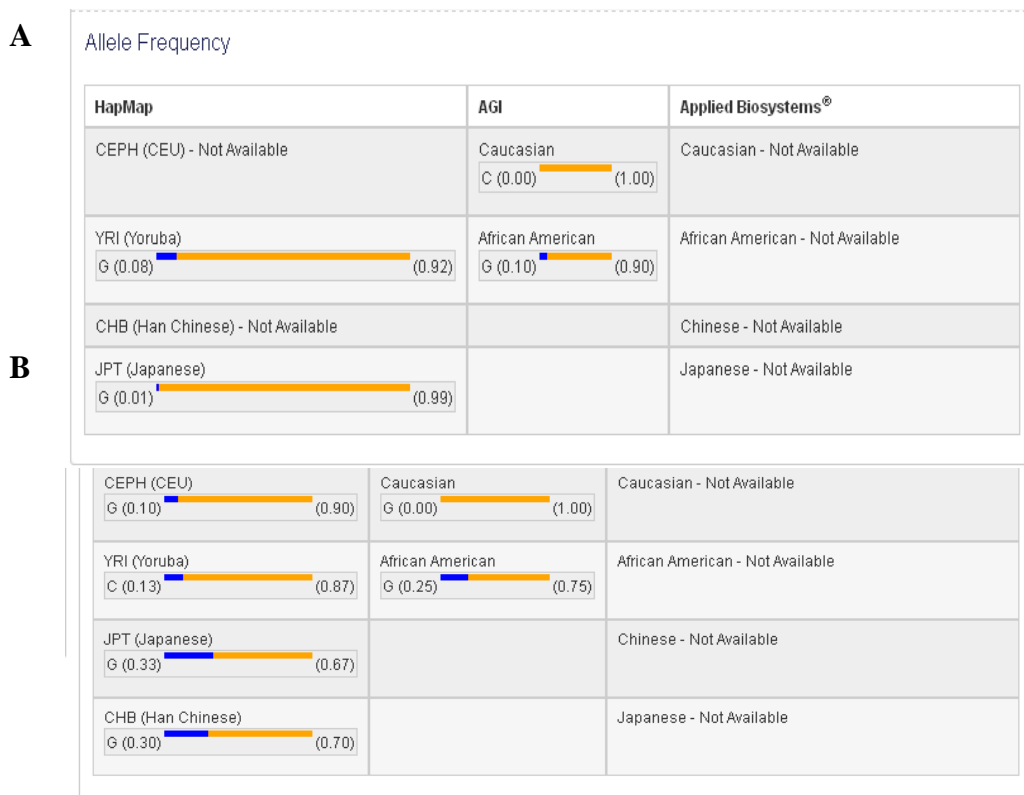
L'associazione fra il marker di senescenza cellulare e la concentrazione plasmatica della betatrofina è stata valutata anche nei soggetti ND, T1DM, T2DM e TX. Come riportato in **Figura 21.A-B**, il numero di paia di basi telomeriche analizzato all'interno dei singoli gruppi di studio, era sovrapponibile con quello della betatrofina.



**Figura 21.A-B.** Lunghezza telomerica valutata sui soggetti ND, T1DM, T2DM e TX (A) e confrontata con la concentrazione della betatrofina (B) (\*= $p < 0.05$  vs ND; #= $p < 0.05$  vs T1DM. Test di Bonferroni).

#### 4.10. Frequenza allelica per i polimorfismi rs1541922 (C/T) e rs892066 (C/G), nell'intera popolazione analizzata.

Come riportato in **Figura 22**, la frequenza allelica per il gene rs1541922 e rs892066 non è stata stimata nella popolazione caucasica dalla ditta Applied Biosystem, mentre per AGI la percentuale è intorno allo 0% per quanto riguarda gli alleli C e G, rispettivamente.

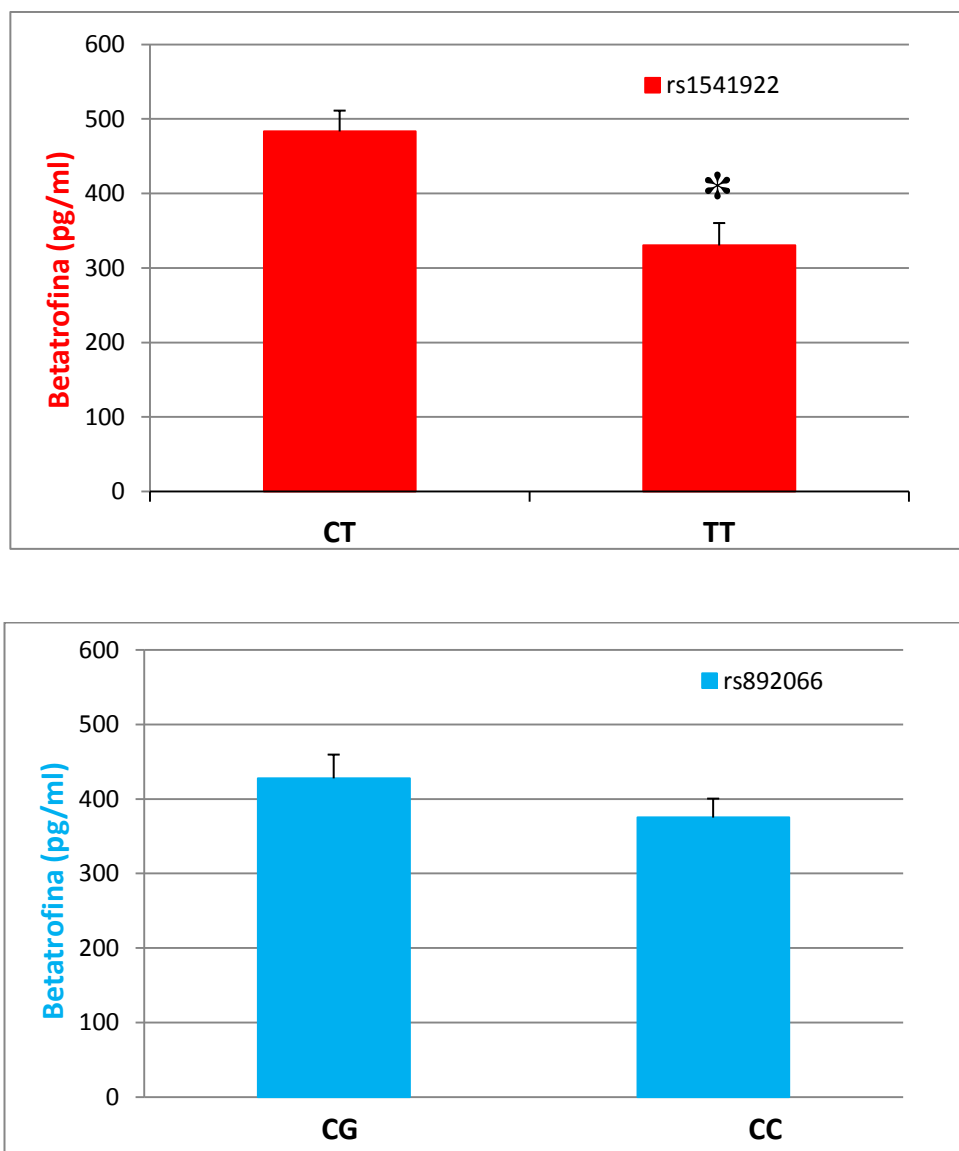


**Figura 22.A-B.** Frequenza allelica attesa nella popolazione caucasica europea per i polimorfismi per rs1541922 (C/T) e rs892066 (C/G) (Life Technology – Applied Biosystem).

Nella popolazione analizzata nel nostro studio, per il polimorfismo rs1541922 abbiamo osservato una frequenza allelica di 0% per CC, 53% per CT e 47% per

TT, mentre per il polimorfismo rs892066 la frequenza era di 37.3% per CC, 62.7% per CG e 0% per GG.

Come riportato in **Figura 23**, non sembra ci sia un'apparente differenza nella concentrazione plasmatica di betatrofina rispetto al genotipo.



**Figura 23.** Associazione fra il genotipo e la secrezione di betatrofina: nella popolazione totale non sembra ci siano differenze nel valore circolante dell'ormone rispetto al genotipo.

## 5. Discussione dei risultati e conclusioni

Come descritto precedentemente, il Diabete Mellito (DM) comprende un gruppo di disturbi metabolici accomunati dal fatto che presentano una persistente instabilità del livello glicemico nel sangue, passando da condizioni d'iperglicemia, più frequente, a quelle d'ipoglicemia. Esistono, prevalentemente, due forme di diabete, di tipo 1 e di tipo 2. Allo stesso tempo, è ben noto che la terapia farmacologica per la cura del diabete ha rappresentato, in questi ultimi anni, un settore di enorme interesse scientifico e uno strumento importante per la cura della malattia e un tentativo per ridurre la sempre più crescente diffusione a livello mondiale.

Nell'ultimo decennio l'attenzione, in particolare per quanto riguarda il diabete mellito tipo 2, è stata rivolta allo studio delle incretine. Già nel 1940, era stato ipotizzato un ruolo per i fattori intestinali nel controllo della glicemia post-prandiale<sup>93</sup>. Questa ipotesi ha trovato conferma in studi condotti 25 anni dopo quando è diventato disponibile il dosaggio radioimmunologico dell'insulina<sup>94,95,96</sup>. Il concetto di "incretine" è nato dall'osservazione che una determinata quantità di glucosio, ingerita per via orale, provoca un incremento di secrezione insulinica maggiore rispetto a quella indotta dalla stessa quantità di glucosio somministrata per via endovenosa, suggerendo così la partecipazione di un qualche fattore a livello intestinale in grado di potenziare la secrezione insulinica<sup>97</sup>. Le principali incretine conosciute, secrete dopo un pasto sono il glucagon-like peptide 1 (GLP-1) e il glucose-dependent insulintropic polipeptide (GIP)<sup>98</sup>, il primo sintetizzato

---

<sup>93</sup> Loew ER, Gray JS, Ivy AC. Is a duodenal hormone involved in carbohydrate metabolism? *Am J Physiol* 1940;270:659-63

<sup>94</sup> Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Arai Y. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1964;24:1076-82

<sup>95</sup> McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. Intestinal factors in the control of insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1965;25:1317-24

<sup>96</sup> Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1967;46:1954-62. 17-19

<sup>97</sup> Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986;29:46-52

<sup>98</sup> Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* 1999;20:876-913; Holst JJ. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) a newly discovered GI hormone. *Gastroenterology* 1994;107:1848-55



prevalentemente dalle cellule enteroendocrine L localizzate nel tratto distale dell'ileo e nel colon, mentre il secondo è sintetizzato dalle cellule K localizzate nel duodeno e nelle anse prossimali del digiuno. E' stato visto e dimostrato come il GLP-1, in combinazione con l'aumento dei livelli d'insulina, sia in grado di potenziare l'azione dello stesso ormone e riduca la secrezione di glucagone (ormone che regola il metabolismo degli zuccheri con azione iperglicemizzante in antagonismo con l'insulina) da parte delle cellule alfa del pancreas. Inoltre, studi effettuati su modelli animali e su cellule pancreatiche umane<sup>99,100,101,102</sup>, hanno dimostrato un effetto protettivo e replicativo sulle cellule beta, mancando, al momento, risultati sulla capacità delle incretine di produrre effetti simili in vivo nei pazienti affetti da diabete. Tuttavia, le osservazioni effettuate nei modelli sperimentali lasciano ben sperare riguardo alla possibilità che, il trattamento con farmaci basati sul meccanismo di azione delle incretine, possa favorire la sopravvivenza delle cellule beta pancreatiche e, quindi, consentire una migliore preservazione del patrimonio di beta cellule nel paziente diabetico. Questo potrebbe essere di grande importanza da un punto di vista clinico, poiché il motivo per cui, nel diabete di tipo 2 con il passare degli anni, la glicemia tende a salire sempre di più e le terapie farmacologiche si rivelano progressivamente meno efficaci, è rappresentato in larga misura dal fatto che il numero di beta cellule si riduce progressivamente.

---

<sup>99</sup> Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, Del Guerra S, D'Aleo V, Piro S, Marselli L, Boggi U, Filipponi F, Tinti L, Salvini L, Wollheim CB, Purrello F, Dotta F. A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2012 Dec;55(12):3262-72. doi:10.1007/s00125-012-2716-9. Epub 2012 Sep 11. PubMed PMID: 22965295.

<sup>100</sup> Lencioni C, Resi V, Romero F, Lupi R, Volpe L, Bertolotto A, Ghio A, Del Prato S, Marchetti P, Di Cianni G. Glucagon-like peptide-1 secretion in women with gestational diabetes mellitus during and after pregnancy. *J Endocrinol Invest*. 2011 Oct;34(9):e287-90. doi: 10.3275/7799. Epub 2011 Jun 7. PubMed PMID:21666414.

<sup>101</sup> Lupi R, Del Guerra S, D'Aleo V, Boggi U, Filipponi F, Marchetti P. The direct effects of GLP-1 and GIP, alone or in combination, on human pancreatic islets. *Regul Pept*. 2010 Dec 10;165(2-3):129-32. doi: 10.1016/j.regpep.2010.04.009. Epub 2010 May 20. PubMed PMID: 20472004.

<sup>102</sup> Cunha DA, Ladrière L, Ortis F, Igoillo-Esteve M, Gurzov EN, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL, Cnop M. Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic beta-cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB. *Diabetes*. 2009 Dec;58(12):2851-62. doi: 10.2337/db09-0685. Epub 2009 Aug 31. PubMed PMID: 19720788; PubMed Central PMCID: PMC2780890.

Sulla base di un meccanismo d'azione simile, nel recentissimo passato è stata individuata una nuova molecola, con caratteristiche simili a quelle delle incretine.

In uno studio condotto, pochi anni fa, in animali un particolare ormone di nuova scoperta, la betatrofina, si poneva come una molecola promettente per la cura del diabete mellito, sia di tipo 1 che di tipo 2, perché era stato visto avere un ruolo nello stimolare la formazione di nuove cellule capaci di produrre insulina. Infatti, il gruppo di Douglas A. Melton dell'Harvard University<sup>103</sup> ha identificato un nuovo gene che hanno chiamato betatrofina che potrebbe essere il fattore mancante che, a livello animale, potrebbe essere la proteina che controlla la replicazione delle beta-cellule in situazioni d'insulino-resistenza, in quanto determina un aumento dei marcatori del ciclo cellulare e della differenziazione in beta-cellula pancreatica<sup>104</sup>. Da studi sperimentali condotti nel topo, sembra che la molecola venga prodotta a livello epatico e del tessuto adiposo bianco, che contenga un segnale di secrezione N-terminale, e che l'espressione ectopica nel fegato porti alla secrezione e rilascio della molecola in circolo. La rilevazione della betatrofina endogena anche nel siero umano ha dimostrato che questa è una molecola naturalmente circolante. Tuttavia, come discusso nel capitolo introduttivo, sono ancora scarsi gli studi presenti in letteratura riguardo al ruolo e gli effetti della betatrofina nell'uomo, in particolare nelle varie forme di diabete.

Questi dati promettenti sono stati il presupposto per un gruppo di ricercatori svedesi che hanno studiato i livelli di questa molecola in persone con diabete di tipo 1. Purtroppo, le persone con questo tipo di diabete arruolate per lo studio, al contrario di quanto ci sia aspettasse, presentavano dei livelli di betatrofina addirittura superiori rispetto ai soggetti sani. Questo dato è stato confermato di recente anche da Espes D e collaboratori<sup>105</sup>, i quali hanno osservato che le concentrazioni circolanti di betatrofina erano, rispetto a soggetti sani, aumentate

---

<sup>103</sup> Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell*. 2013 May 9;153(4):747-58. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.008. Epub 2013 Apr 25. PubMed PMID: 23623304; PubMed Central PMCID: PMC3756510.

<sup>104</sup> Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2013; 153:747-58

<sup>105</sup> Espes D, Lau J, Carlsson PO. Increased circulating levels of betatrophin in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2014 Jan;57(1):50-3.

nei diabetici di tipo 1, in contrasto con ciò che è stato recentemente descritto in un modello murino di diabete insulino-dipendente.

In letteratura non sono presenti molti studi su quest'ormone di recente scoperta. Anche per quanto riguarda il diabete mellito di tipo 2, i pochi lavori presenti sono stati condotti su modelli animale. Per questo motivo, gli effetti e il ruolo dell'ormone nell'uomo non sono ancora chiari e definiti. In un recente studio, Jiao Y e colleghi<sup>106</sup> hanno somministrato nel topo il peptide S961, antagonista del recettore per l'insulina, dimostrando un aumento dell'espressione genica di betatrofina e la replicazione beta cellulare. Tuttavia, mentre le beta-cellule murine, trapiantate sotto capsula renale, sono indotte alla replicazione dall'incremento di betatrofina, quelle umane non sembrano rispondere allo stesso stimolo.

La conclusione di questi primi studi potrebbe essere quella che, il semplice aumento di questo nuovo ormone, non sia sufficiente a proteggere le persone dal diabete di tipo 1 e 2. Tuttavia, tutti i lavori sembrano confermare che la betatrofina possa avere un meccanismo fisiologico che potrebbe portare, se non proprio alla protezione o replicazione, alla preservazione delle beta-cellule pancreatiche nel tempo. In base a questi lavori è possibile ipotizzare che, un aumento farmacologico di quest'ormone, attraverso somministrazione o induzione, in combinazione o meno con altri farmaci, potrebbe permettere di bloccare o ritardare la comparsa del diabete.

Poiché, in questi ultimi anni, sono stati ottenuti risultati sia entusiasmanti che deludenti sulla betatrofina, lo scopo di questo studio è stato quello di cercare di far chiarezza sul ruolo che questo ormone potrebbe avere nella malattia diabetica e possibili differenze fra pazienti affetti da diabete mellito tipo 1, tipo 2 e pazienti sottoposti a trapianto di pancreas, confrontandoli con un gruppo di soggetti sani.

Il primo passo è stato quello di capire se veramente la molecola era circolante nel plasma e a quali concentrazioni. Il dato interessante che è emerso nella nostra popolazione è un'enorme variabilità della concentrazione, con un valore medio intorno a 164 pg/ml.

---

<sup>106</sup> Jiao Y, Le Lay J, Yu M, Naji A, Kaestner KH. Elevated mouse hepatic betatrophin expression does not increase human beta-cell replication in the transplant setting. *Diabetes*. 2013 Dec 18

Rispetto agli studi presenti in letteratura, per la prima volta abbiamo analizzato la presenza e il ruolo della betatrofina in una popolazione di pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 e tipo 2, inserendo anche soggetti che erano stati sottoposti a trapianto di pancreas, in modo tale da poter valutare come un controllo metabolico potesse incidere o no sulla concentrazione della proteina.

Il primo passo è stato quello di mettere in relazione la concentrazione plasmatica della betatrofina con il genere maschile e femminile nella popolazione studiata suddivisa per tipologia. Abbiamo riscontrato un significativo aumento del valore dell'ormone nel genere maschile rispetto a quello femminile nei controlli, mentre nei tipi 1 e trapiantati la situazione si è invertita, con un aumento significativo della betatrofina nelle femmine rispetto ai maschi, e tale dato potrebbe essere spiegato con qualche fattore legato alla patologia stessa che influirebbe sulla concentrazione dell'ormone. I tipi 2, invece, non hanno mostrato nessuna differenza significativa di concentrazione della molecolare tra i due generi, ipotizzando la presenza di altri fattori legati a questa tipologia di diabete, come fattori genetici o glicometabolici, che influirebbero sul valore plasmatico della betatrofina.

Mettendo in relazione la concentrazione della betatrofina con i parametri glicometabolici e di funzionalità d'organo della nostra popolazione, abbiamo osservato una correlazione negativa con l'età, l'emoglobina glicata, i trigliceridi e la glicemia, mentre la correlazione era positiva con la concentrazione di HDL.

Per quanto riguarda l'età, in letteratura ci sono alcuni dati contrastanti sulla correlazione con questa proteina, poiché alcuni autori non hanno trovato associazione mentre altri hanno osservato una correlazione positiva: tuttavia, questi studi sono stati fatti solo su un tipo di popolazione, prevalentemente quella composta da soggetti affetti da diabete mellito tipo 2<sup>107</sup>. Tuttavia, basandosi sui risultati ottenuti anche con altre proteine, è ragionevole supporre che, effettivamente, questa proteina possa ridursi con l'età.

---

<sup>107</sup> Chen X, Lu P, He W, Zhang J, Liu L, Yang Y, Liu Z, Xie J, Shao S, Du T, Su X, Zhou X, Hu S, Yuan G, Zhang M, Zhang H, Liu L, Wang D, Yu X. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jan;100(1):E96-E100

Per la prima volta in questo studio abbiamo dimostrato come le HDL, nell'intera popolazione studiata, e c-peptide, nella popolazione escluso il tipo 1, siano positivamente associati alla betatrofina.

Un dato interessante emerso dal confronto con i parametri glicometabolici, è la correlazione negativa con la glicemia. In letteratura è presente solo un lavoro che associa un aumento della glicemia con un incremento nella secrezione di betatrofina<sup>108</sup>: in questo studio gli autori hanno effettuato un dosaggio dopo somministrazione di un carico di glucosio, a pazienti T2DM. Anche noi abbiamo osservato quest'aumento dopo una curva da carico, con un rapporto diretto fra incremento della glicemia, aumento della secrezione d'insulina ed aumento della concentrazione della betatrofina. Tuttavia, la correlazione dell'ormone con la glicemia nell'intera popolazione studiata ha dato un risultato opposto, mostrando una riduzione del rilascio associato a un aumento della concentrazione di glucosio nel sangue. Questo dato, pur contrastante con le proprietà dell'ormone, potrebbe essere spiegato e confermato dopo un'esposizione in cronico di cellule secernenti la betatrofina, poiché è questo che probabilmente avviene in vivo. Si deve tener presente che il dosaggio rappresenta una fotografia del momento e, considerando la popolazione studiata, non è difficile ipotizzare una glicemia elevata nel tempo.

Di questi parametri che sono risultati significativamente correlati con la betatrofina, età, HDL e c-peptide sembrerebbero quelli che incidono, o sono modulati, maggiormente dall'ormone.

I risultati ottenuti dalle correlazioni potrebbero essere parzialmente spiegati con lo studio delle singole popolazioni, in particolare per quello che riguarda il ruolo della glicemia. In particolare, abbiamo confermato come esista una marcata riduzione della proteina nel paziente T2DM. Questo dato è in accordo con la letteratura, eccetto che per lo studio di Chen X e colleghi<sup>109</sup>, in cui è stato ottenuto un risultato opposto. Tuttavia, come accennato anche precedentemente, nei

---

<sup>108</sup> Chen X, Lu P, He W, Zhang J, Liu L, Yang Y, Liu Z, Xie J, Shao S, Du T, Su X, Zhou X, Hu S, Yuan G, Zhang M, Zhang H, Liu L, Wang D, Yu X. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jan;100(1):E96-E100

<sup>109</sup> Chen X, Lu P, He W, Zhang J, Liu L, Yang Y, Liu Z, Xie J, Shao S, Du T, Su X, Zhou X, Hu S, Yuan G, Zhang M, Zhang H, Liu L, Wang D, Yu X. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jan;100(1):E96-E100. doi: 10.1210/jc.2014-2300. PubMed PMID: 25303484.

pazienti di tipo 2, soprattutto prima della diagnosi conclamata, le cellule sono esposte a lunghi periodi di glicemia sopra i livelli di normalità e, come per studi su altri modelli cellulari, il fenomeno della glucostossicità può produrre danni, fra gli altri, a livello di sintesi e secrezione proteica<sup>110,111,112,113</sup>.

Un dato importante ma confermato come abbiamo accennato dalla letteratura, riguarda un aumento dei livelli plasmatici dell'ormone nei pazienti T1DM: questo risultato potrebbe essere correlato proprio al potenziale ruolo della betatrofina d'induzione della differenziazione beta-cellulare in quanto, nel tipo 1, le cellule insulino secernenti sono distrutte da una reazione autoimmune e il pancreas avrebbe la "necessità" di poterle sostituire. Tuttavia, è probabile che venga prodotta più betatrofina poiché ogni tentativo di sostituzione non va a buon fine per la presenza di autoanticorpi. Questo dato troverebbe conferma nei soggetti sottoposti a trapianto di pancreas i quali, oltre a migliorare il loro controllo metabolico, risultano immunodepressi e, pertanto, privi di reazione autoimmune contro le nuove beta-cellule pancreatiche. Questo potrebbe spiegare sia il significativo aumento di betatrofina plasmatica nei T1DM, sia un valore simile ai ND nei soggetti TX.

Anche la correlazione negativa della betatrofina con i trigliceridi potrebbe essere spiegata in base al tipo di popolazione studiata. Wang Y e collaboratori<sup>114</sup>, in uno studio effettuato sul topo, hanno osservato una riduzione dei livelli di trigliceridi plasmatici dopo silenziamento del gene che regola la secrezione della proteina. Questo è stato spiegato con il ruolo inibitorio che la betatrofina

---

<sup>110</sup> Welsh N, Cnop M, Kharroubi I, Bugliani M, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL. Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes*. 2005 Nov;54(11):3238-44. PubMed PMID: 16249450.

<sup>111</sup> Del Guerra S, Grupillo M, Masini M, Lupi R, Bugliani M, Torri S, Boggi U, Del Chiaro M, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P. Gliclazide protects human islet beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007 Mar;23(3):234-8. PubMed PMID: 16952202.

<sup>112</sup> Lupi R, Bugliani M, Del Guerra S, Del Prato S, Marchetti P, Boggi U, Filipponi F, Mosca F. Transcription factors of beta-cell differentiation and maturation in isolated human islets: effects of high glucose, high free fatty acids and type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006 Sep;16(6):e7-8. Epub 2006 Mar 31. PubMed PMID: 16935697.

<sup>113</sup> Marchetti P, Lupi R, Lorenzetti M, Giannarelli R, Del Guerra S, Tellini C, Coppelli A, Lencioni C, Marselli L, Carmellini M, Mosca F, Navalesi R. Pancreatic glucagon damages isolated human islet function. *Transplant Proc*. 1998 Mar;30(2):397. PubMed PMID: 9532099.

<sup>114</sup> Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, Gromada J, Valenzuela DM, Cohen JC, Hobbs HH. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 1;110(40):16109-14.

sembrerebbe esercitare sulla lipoproteina lipasi: un aumento dell'enzima comporterebbe una maggiore distruzione dei trigliceridi. In questo studio, i livelli plasmatici di trigliceridi nei topi Angptl8 (- / -) erano simili agli animali Wild-type a digiuno ma, paradossalmente, erano significativamente inferiori dopo il pasto. Nel nostro studio l'espressione genica per LPL era opposta rispetto al valore della betatrofina, confermando il fattore inibitorio che l'ormone potrebbe esercitare su questo enzima. Tuttavia, nella popolazione intera la betatrofina correla negativamente con i trigliceridi: quest'andamento opposto rispetto a quello atteso potrebbe essere associato al modello di studio, al tipo di popolazione e al fatto che tutti i nostri prelievi sono stati presi a digiuno.

Una volta valutata la presenza e il ruolo della betatrofina, abbiamo cercato di spiegare le cause della variabilità dell'ormone trovato in circolo.

Da alcuni anni, nel nostro laboratorio, stiamo valutando il ruolo della senescenza cellulare sullo sviluppo del diabete. Le cellule adulte di un organismo, nel corso degli anni, vanno incontro a un deterioramento, fenomeno conosciuto come "cellular senescence", ossia, letteralmente, "invecchiamento cellulare". Infatti, una conseguenza, speculativa e potenzialmente rilevante, dell'accumularsi delle cellule senescenti è il loro impatto, per esempio, sulle cellule staminali (o comunque sui precursori cellulari) e sulle loro nicchie. Tale accumulo potrebbe esaurire i tessuti dei pool delle cellule staminali o delle cellule progenitrici, e distruggere il loro microambiente, alterandone la proliferazione, la differenziazione e la mobilitazione. La cellular senescence risente di fattori sia fisiologici, legati al normale processo d'invecchiamento cellulare, che patologici, tanto da risultare esaltata in alcune patologie croniche e degenerative. Il principale marcatore di tale fenomeno è stato individuato nella lunghezza delle estremità telomeriche. Com'è noto, molti parametri biologici legati alla senescenza cellulare risentono sia dell'effetto fisiologico che di quello relativo a processi cronici e degenerativi. In questo contesto, numerosi studi hanno evidenziato l'importante ruolo svolto dai telomeri in alcune patologie correlate all'età, che esasperano il processo d'invecchiamento biologico accelerando, in maniera significativa, l'accorciamento delle estremità telomeriche. I telomeri sono strutture lineari nucleoproteiche localizzate alle estremità dei cromosomi eucariotici, e consistono

di sequenze di DNA esamerico 5'-TTAGGG-3' ripetute in tandem. Ad ogni ciclo di divisione cellulare i telomeri subiscono un graduale accorciamento, a causa dell'incapacità delle DNA polimerasi di replicare completamente le estremità telomeriche, e tale processo si protrae fino al raggiungimento di una lunghezza minima critica (limite di Hayflick) che segnala la fine della proliferazione, l'inizio della senescenza e la successiva morte per apoptosi della cellula. La perdita di DNA all'estremità cromosomica può essere evitata dalla telomerasi, un complesso ribonucleoproteico costituito da alcune componenti essenziali per l'attività dell'enzima: una subunità a RNA (hTR, human telomerase RNA) e una subunità catalitica (hTERT, human Telomerase Reverse Transcriptase).

In questi anni abbiamo effettuato numerosi studi sulla lunghezza dei telomeri in soggetti sani e pazienti con diabete mellito arrivando a dimostrare, fra le altre cose, che c'è una significativa riduzione nei pazienti T2DM e un significativo aumento nei T1DM della lunghezza telomerica rispetto a ND. Inoltre, nei soggetti TX questo valore ritorna simile ai controlli.

Nello studio attuale, la lunghezza telomerica correla positivamente con la betatrofina in tutta la popolazione analizzata e risulta sovrapponibile quando valutiamo la concentrazione dell'ormone nelle singole popolazioni. Allo stato attuale non è possibile dire se la betatrofina possa regolare l'accorciamento dei telomeri o se gli stessi possano controllare la secrezione della proteina: tuttavia, è ragionevole supporre un coinvolgimento di questo marcatore nella fisiopatologia della betatrofina.

Infine, abbiamo cercato di valutare il ruolo che la genetica potrebbe svolgere nella modulazione ormonale, studiando due polimorfismi associati al gene che controlla la secrezione della betatrofina. Gli SNPs utilizzati nella tesi sono stati da noi, per la prima volta, studiati nella popolazione caucasica. Premettendo che la casistica non è ancora sufficiente per dare una conclusione definitiva al ruolo di questi polimorfismi, abbiamo osservato una significativa riduzione della concentrazione di betatrofina plasmatica in presenza dello specifico genotipo TT rispetto ai soggetti portatori del genotipo eterozigote CT, relativi al polimorfismo rs1541922. Il dato interessante è che, nei soggetti sani, la presenza dell'allele T in doppia copia è associata a una riduzione della



concentrazione di betatrofina plasmatica. Tuttavia, se questo polimorfismo possa incidere o no sulla modulazione dell'ormone dovrà essere valutato in futuro. Il dato particolare è la non presenza di due alleli che, forse, potrebbero giocare un ruolo significativo nella regolazione della secrezione di betatrofina.

In conclusione, per la prima volta in questa tesi è stata analizzata la presenza e la concentrazione di betatrofina in una popolazione eterogenea di soggetti diabetici e di pazienti sottoposti a trapianto di pancreas. Le correlazioni osservate, in particolare riguardo al c-peptide, insieme con la normalizzazione dell'ormone nei pazienti trapiantati, suggeriscono un ruolo potenziale come biomarker di funzionalità, o della massa, delle cellule beta-pancreatiche. Se la betatrofina possa essere regolata dalla lunghezza dei telomeri o dalla presenza di polimorfismi, dovrà essere accuratamente studiata aumentando il numero di soggetti e valutandone la regolazione nel tempo.

## 6. Bibliografia

1. M. Soucek. Metabolic syndrome; Vnitr Lek 2009, 55:618-621
2. Gero L., Type 1 diabetes mellitus: pathogenesis, symptoms and therapy. Orvb Hetil, 2010, 151((13):533-9. Review
3. Goldberg E and Krause I. Infection and type 1 diabetes mellitus - a two edged sword? Autoimmun Rev., 8(8):682{6, 2009
4. Kashyap, S. R., & Defronzo, R. A. (2007). The insulin resistance syndrome: physiological considerations. Diab Vasc Dis Res., 4(1):13-9
5. S. Brunton. Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder. Postgrad Med, 121:68{81, 2009
6. American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus (Position Statement). Diabetes Care 2004, 27: S88-S90.
7. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature 2001;414:782-7
8. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2006;29 (suppl 1):S43:8.
9. American Diabetes Association. Classification of diabetes. Diabetes 2001 Vital Statistics 5-8.
10. Scheen, A.J., and Lefe`bvre, P.J. (1996). Insulin action in man. Diabetes Metab. 22, 105–110.
11. Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. Regul Pept 2008;146:4-11.
12. Rhodes CJ. Type 2 diabetes - a matter of beta-cell life and death Science 2005;307:380-4.
13. James WP. The fundamental drivers of the obesity epidemic. Obes Rev 2008; 9 Suppl 1: 6-13.
14. Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. Hum Genet. 2013 Apr;132(4):359-83.

15. Folli F, Okada T, Perego C, Gunton J, Liew CW, Akiyama M, D'Amico A, La Rosa S, Placidi C, Lupi R, Marchetti P, Sesti G, Hellerstein M, Perego L, Kulkarni RN. Altered insulin receptor signalling and  $\beta$ -cell cycle dynamics in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2011;6(11): e28050.
16. Kahn SE. The relative contribution of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003;46:3-19
17. Soumaya K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes. *Adv Exp Med Biol*. 2012;771:240-51. Review.
18. Marchetti P, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Marselli L, Boggi U. The beta-cell in human type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol*. 2010;654:501-14. Review.
19. Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes* 1987; 36: 274–283
20. Ohneda A, Watanabe K, Horigome K, Sakai T, Kai Y, Oikawa S. Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:504-10
21. Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol*. 2003, 56(1):1-10. Review.
22. Secrest AM, Costacou T, Gutelius B, Miller RG, Songer TJ, Orchard TJ. Associations Between Socioeconomic Status and Major Complications in Type 1 Diabetes: The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication (EDC) Study. *Ann Epidemiol*. 2011 May;21(5):374-81.
23. Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999, 42(12):1395-403.
24. Songini M, Lombardo C. The Sardinian way to type 1 diabetes. *J Diabetes Sci Technol*. 2010 Sep 1;4(5):1248-55. Review
25. Muller WA, Faloona GR, Unger RH. Hyperglucagonemia in diabetic ketoacidosis. Its prevalence and significance. *Am J Med* 1973; 54 : 52–57

26. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med*. 2009, 360(16):1646-54. Review.
27. Csorba TR, Lyon AW, Hollenberg MD. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2010, 47(2):51-71.
28. Płaczkiewicz-Jankowska E, Szybiński Z, Huszno B. [Environmental factors in the development of type 1 diabetes -- a new insight]. *Przegl Lek*. 2007, 64(3):175-9. Review
29. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 1993; Sep 30; 329 (14):977-86.
30. Meloche RM. Transplantation for the treatment of type 1 diabetes. *World J Gastroenterol*. 2007, 13(47):6347-55. Review.
31. Berman A, Pawelec K, Fiedor P. Allogeneic transplantation of isolated islet cells in clinical practice. *Pol Arch Med Wewn*. 2009, 119(5):326-32. Review.
32. Nano R, Clissi B, Melzi R, Calori G, Maffi P, Antonioli B, Marzorati S, Aldrighetti L, Freschi M, Grochowiecki T, Socci C, Secchi A, Di Carlo V, Bonifacio E, Bertuzzi F. Islet isolation for allotransplantation: variables associated with successful islet yield and graft function. *Diabetologia*. 2005, 48(5):906-12
33. Bertuzzi F, Ricordi C. Prediction of clinical outcome in islet allotransplantation. *Diabetes Care*. 2007, 30(2):410-7. Review.
34. Nauck MA, El-Ouaghli A, Gabrys B, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Gallwitz B, Schmidt WE, Meier JJ. Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept*. 2004 Nov 15;122(3):209-17.
35. Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol*. 2003 Feb;17(2):161-71. Review
36. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev*. 2008 Dec;60(4):470-512. doi: 10.1124/pr.108.000604. Epub 2008 Dec 12. Review.

37. Kazafeos K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Aug;93 Suppl 1:S32-6. doi: 10.1016/S0168-8227(11)70011-0. Review.
38. Gareth E. Lim and Patricia L. Brubaker. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. The View From Within. doi: 10.2337/db06-S020 *Diabetes* December 2006 vol. 55 no. Supplement 2 S70-S77.
39. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 1986 Jan;29(1):46-52.
40. Hans R. Schöler, The Potential of Stem Cells: An Inventory in Nikolaus Knoepffler, Dagmar Schipanski, and Stefan Lorenz Sorgner (a cura di), *Human biotechnology as Social Challenge*, Ashgate Publishing, Ltd, 2007, p. 28, ISBN 978-0-7546-5755-2
41. Regenerative Medicine Glossary in *Regenerative Medicine*, vol. 4, 4s, luglio 2009, pp. S30 Section 3.44, DOI:10.2217/rme.09.s1, PMID 19604041
42. James Byrne, The definition and etymology of the word pluripotency in *eJournal of Cellular Biotechnology*, 1;eP2, 29 giugno 2011.
43. Voltarelli JC, Couri CE, Rodrigues MC, Moraes DA, Stracieri AB, Pieroni F, Navarro G, Leal AM, Simões BP. Stem cell therapies for type 1 diabetes mellitus.
44. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047–1053
45. Meier, J.J., Butler, A.E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2008). Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57, 1584–1594.
46. Kushner, J.A., Ciemerych, M.A., Sicinska, E., Wartschow, L.M., Teta, M., Long, S.Y., Sicinski, P., and White, M.F. (2005). Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3752–3762.

47. Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R., Martí'n, J., Ortega, S., Martí'n-Caballero, J., Flores, J.M., Córdo'n-Cardo, C., and Barbacid, M. (2000). Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J.* 19, 3496–3506.
48. Paris, M., Bernard-Kargar, C., Berthault, M.F., Bouwens, L., and Ktorza, A. (2003). Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology* 144, 2717–2727.
49. Porat, S., Weinberg-Corem, N., Tornovsky-Babaey, S., Schyr-Ben-Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Dadon, D., Granot, Z., Ben-Hur, V., White, P., et al. (2011). Control of pancreatic b cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab.* 13, 440–449.
50. Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., et al. (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 117, 246–257.
51. Parsons, J.A., Brelje, T.C., and Sorenson, R.L. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130, 1459–1466.
52. Wang, Q., and Brubaker, P.L. (2002). Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 45, 1263–1273.
53. Drucker, D.J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 3, 153–165.
54. Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Suzuki, T., Kudo, H., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Kaneko, K., et al. (2008). Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322, 1250–1254.
55. Tomita, T., Doull, V., Pollock, H.G., and Krizsan, D. (1992). Pancreatic islets of obese hyperglycemic mice (ob/ob). *Pancreas* 7, 367–375.

56. El Ouaamari A, Kawamori D, Dirice E, Liew CW, Shadrach JL, Hu J, Katsuta H, Hollister-Lock J, Qian WJ, Wagers AJ, Kulkarni RN. Liver-derived systemic factors drive  $\beta$  cell hyperplasia in insulin-resistant states. *Cell Rep* 2013; 3: 401-410
57. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Nijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y. Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 2008; 322: 1250-1254.
58. El Ouaamari, A., Kawamori, D., Dirice, E., Liew, C.W., Shadrach, J.L., Hu, J., Katsuta, H., Hollister-Lock, J., Qian, W.J., Wagers, A.J., and Kulkarni, R.N. (2013). Liver-derived systemic factors drive b cell hyperplasia in insulin-resistant states. *Cell Rep* 3, 401–410.
59. Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Suzuki, T., Kudo, H., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Kaneko, K., et al. (2008). Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322, 1250–1254.
60. Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2013; 153: 747-758.
61. Schäffer L, Brand CL, Hansen BF, Ribel U, Shaw AC, Slaaby R, Sturis J. A novel high-affinity peptide antagonist to the insulin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: 380-383.
62. Vikram, A.; Jena, G. S961, an insulin receptor antagonist causes hyperinsulinemia, insulin-resistance and depletion of energy stores in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 398, 260–265.
63. Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2013; 153: 747-758.
64. Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liverenriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424: 786-792.
65. Mattijssen F, Kersten S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821: 782-789.

66. Ren, G., Kim, J.Y., and Smas, C.M. (2012). Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E334–E351.
67. Tseng, Y.H.; Ke, P.Y.; Liao, C.J.; Wu, S.M.; Chi, H.C.; Tsai, C.Y.; Chen, C.Y.; Lin, Y.H.; Lin, K.H. Chromosome 19 open reading frame 80 is upregulated by thyroid hormone and modulates autophagy and lipid metabolism. *Autophagy* 2014, 10, 20–31.
68. Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2013; 153: 747-758
69. Ren, G.; Kim, J.Y.; Smas, C.M. Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012, 303, E334–E351
70. Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liverenriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424: 786-792.
71. Mattijssen F, Kersten S (2012) Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietinlike proteins. *Biochim Biophys Acta* 1821(5):782–789.
72. Quagliarini F, et al. (2012) Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(48):19751–19756.
73. Quagliarini, F.; Wang, Y.; Kozlitina, J.; Grishin, N.V.; Hyde, R.; Boerwinkle, E.; Valenzuela, D.M.; Murphy, A.J.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 19751–19756.
74. Lee EC, et al. (2009) Identification of a new functional domain in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) and angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) involved in binding and inhibition of lipoprotein lipase (LPL). *J Biol Chem* 284(20):13735–13745.
75. Ono M, et al. (2003) Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. *J Biol Chem* 278(43):41804–41809.
76. Quagliarini, F.; Wang, Y.; Kozlitina, J.; Grishin, N.V.; Hyde, R.; Boerwinkle, E.; Valenzuela, D.M. Murphy, A.J.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H.



- Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 19751–19756.
77. . Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, Gromada J, Valenzuela DM, Cohen JC, Hobbs HH. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 1;110(40):16109-14. doi: 10.1073/pnas.1315292110
  78. Garcia-Arcos I, et al. (2013) Adipose-specific lipoprotein lipase deficiency more profoundly affects brown than white fat biology. *J Biol Chem* 288(20):14046–14058.
  79. Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992;29:243-68.
  80. Osborne JC Jr, Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS, Olivecrona T. Studies on activation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 1985;24:5606-11.
  81. Cryer A. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *Int J Biochem* 1981;13:525-41.
  82. Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim Biophys Acta* 1970;210:473-82.
  83. Lithell H, Boberg J, Hellsing K, Lundqvist G, Vessby B. Lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states. *Atherosclerosis* 1978;30:89-94.
  84. Wing DR, Salalman MR, Robinson DS. Clearing-factor lipase in adipose tissue. Factors influencing the increase in enzyme activity produced on incubation of tissue from starved rats in vitro. *Biochem J* 1966;99:648-56.
  85. Ashby P, Robinson DS. Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipase. *Biochem J* 1980;188:185-92
  86. Hamosh M, Hamosh P. The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest* 1975;55:1132-5.

87. Price TM, O'Brien SN, Welter BH, George R, Anandjiwala J, Kilgore M. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase: possible mechanism of body fat distribution. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:101-7
88. Espes D, Lau J and Carlsson PO: Increased circulating levels of betatrophin in individuals with long standing type 1 diabetes. *Diabetologia* 57: 50-53, 2014
89. Chen X, Lu P, He W, Zhang J, Liu L, Yang Y, Liu Z, Xie J, Shao S, Du T, Su X, Zhou X, Hu S, Yuan G, Zhang M, Zhang H, Liu L, Wang D, Yu X. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jan;100(1):E96-E100. doi: 10.1210/jc.2014-2300.
90. Espes D, Martinell M, Carlsson PO. Increased circulating betatrophin concentrations in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:323407. doi: 10.1155/2014/323407. Epub 2014 May 22. PubMed PMID: 24963292.
91. Fu Z, Berhane F, Fite A, Seyoum B, Abou-Samra AB, Zhang R. Elevated circulating lipasin/betatrophin in human type 2 diabetes and obesity. *Sci Rep.* 2014 May 23;4:5013. doi: 10.1038/srep05013. PubMed PMID: 24852694.
92. Araújo TG, Oliveira AG, Saad MJ. Insulin-resistance-associated compensatory mechanisms of pancreatic Beta cells: a current opinion. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013 Oct 14;4:146. doi: 10.3389/fendo.2013.00146. Review. PubMed PMID: 24133484.
93. Loew ER, Gray JS, Ivy AC. Is a duodenal hormone involved in carbohydrate metabolism? *Am J Physiol* 1940;270:659-63
94. Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Arai Y. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1964;24:1076-82
95. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. Intestinal factors in the control of insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1965;25:1317-24

96. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1967;46:1954-62. 17-19
97. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986;29:46-52
98. Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* 1999;20:876-913; Holst JJ. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) a newly discovered GI hormone. *Gastroenterology* 1994;107:1848-55
99. Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, Del Guerra S, D'Aleo V, Piro S, Marselli L, Boggi U, Filipponi F, Tinti L, Salvini L, Wollheim CB, Purrello F, Dotta F. A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2012 Dec;55(12):3262-72. doi:10.1007/s00125-012-2716-9. Epub 2012 Sep 11.
100. Lencioni C, Resi V, Romero F, Lupi R, Volpe L, Bertolotto A, Ghio A, Del Prato S, Marchetti P, Di Cianni G. Glucagon-like peptide-1 secretion in women with gestational diabetes mellitus during and after pregnancy. *J Endocrinol Invest*. 2011 Oct;34(9):e287-90. doi: 10.3275/7799. Epub 2011 Jun 7.
101. Lupi R, Del Guerra S, D'Aleo V, Boggi U, Filipponi F, Marchetti P. The direct effects of GLP-1 and GIP, alone or in combination, on human pancreatic islets. *Regul Pept*. 2010 Dec 10;165(2-3):129-32. doi: 10.1016/j.regpep.2010.04.009. Epub 2010 May 20.
102. Cunha DA, Ladrière L, Ortis F, Igoillo-Estève M, Gurzov EN, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL, Cnop M. Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic beta-cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB. *Diabetes*. 2009 Dec;58(12):2851-62. doi: 10.2337/db09-0685. Epub 2009 Aug 31.
103. Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell*. 2013 May 9;153(4):747-58. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.008. Epub 2013 Apr 25. PubMed PMID: 23623304.
104. Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell* 2013; 153:747-58

- 105.** Espes D, Lau J, Carlsson PO. Increased circulating levels of betatrophin in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2014 Jan;57(1):50-3.
- 106.** Jiao Y, Le Lay J, Yu M, Naji A, Kaestner KH. Elevated mouse hepatic betatrophin expression does not increase human beta-cell replication in the transplant setting. *Diabetes*. 2013 Dec 18
- 107.** Chen X, Lu P, He W, Zhang J, Liu L, Yang Y, Liu Z, Xie J, Shao S, Du T, Su X, Zhou X, Hu S, Yuan G, Zhang M, Zhang H, Liu L, Wang D, Yu X. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jan;100(1):E96-E100
- 108.** Chen X, Lu P, He W, Zhang J, Liu L, Yang Y, Liu Z, Xie J, Shao S, Du T, Su X, Zhou X, Hu S, Yuan G, Zhang M, Zhang H, Liu L, Wang D, Yu X. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jan;100(1):E96-E100
- 109.** Chen X, Lu P, He W, Zhang J, Liu L, Yang Y, Liu Z, Xie J, Shao S, Du T, Su X, Zhou X, Hu S, Yuan G, Zhang M, Zhang H, Liu L, Wang D, Yu X. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jan;100(1):E96-E100. doi: 10.1210/jc.2014-2300. PubMed PMID: 25303484.
- 110.** Welsh N, Cnop M, Kharroubi I, Bugliani M, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL. Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes*. 2005 Nov;54(11):3238-44. PubMed PMID:16249450.
- 111.** Del Guerra S, Grupillo M, Masini M, Lupi R, Bugliani M, Torri S, Boggi U, Del Chiaro M, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P. Gliclazide protects human islet beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007 Mar;23(3):234-8. PubMed PMID: 16952202.

- 112.** Lupi R, Bugliani M, Del Guerra S, Del Prato S, Marchetti P, Boggi U, Filipponi F, Mosca F. Transcription factors of beta-cell differentiation and maturation in isolated human islets: effects of high glucose, high free fatty acids and type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Sep;16(6):e7-8. Epub 2006 Mar 31.
- 113.** Marchetti P, Lupi R, Lorenzetti M, Giannarelli R, Del Guerra S, Tellini C, Coppelli A, Lencioni C, Marselli L, Carmellini M, Mosca F, Navalesi R. Pancreatic glucagon damages isolated human islet function. *Transplant Proc.* 1998 Mar;30(2):397.
- 114.** Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, Gromada J, Valenzuela DM, Cohen JC, Hobbs HH. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 1;110(40):16109-14.

## **7. Ringraziamenti**